



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Marlene Sofia Peixoto Ferreira

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS COM PACLITAXEL PARA TRATAMENTO DO
GLIOMA**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Paulo Costa e Doutora Cláudia Marques

Setembro/2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

“When you want to give up, and your heart about to break, remember that you’ve perfect, God makes no mistakes”. Bon Jovi

Agradecimentos

Apesar de a dissertação ser um trabalho individual, os apoios e incentivos são fulcrais para a concretização da mesma. Foram diversas as ajudas com que fui presenteada ao longo deste trabalho e por isso cabe-me agradecer a todos com muito carinho.

Ao Prof Doutor Paulo Costa, orientador da dissertação, os agradecimentos são vastos. Quero agradecer a competência científica, todo o acompanhamento técnico e teórico, a disponibilidade, o incentivo e a liberdade de trabalho que me permitiu ser mais autónoma. Agradeço, em especial, o apoio, força e compreensão que me deu num momento extremamente difícil deste percurso. Por fim, e não menos importante, agradeço todas as críticas, correções e sugestões que fez na preparação deste trabalho.

À Doutora Cláudia Marques, coorientadora da dissertação, todo o apoio e compreensão. As suas sugestões e críticas ao trabalho melhoraram imenso o mesmo, ao qual agradeço imenso.

Ao Prof Doutor Domingos Ferreira, Diretor do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica por todo o apoio, disponibilidade e boa disposição que tão o caracteriza.

Ao Prof Doutor José Manuel Sousa Lobo, antigo Diretor do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica e atual Diretor da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela disponibilidade e apoio para poder trabalhar no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

Aos restantes Professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, Prof Doutora Helena Amaral, Prof Doutor Paulo Lobão, Prof Doutor Delfim Santos, Prof Doutora Isabel Almeida e Prof Doutor Maurício Barbosa, que tive o prazer de ter no meu percurso académico, agradeço por todas as competências e todo o conhecimento científico de tecnologia farmacêutica que me transmitiram.

Às meninas do laboratório de Investigação, Rita Azevedo, Verónica, Rita Moreira, Bárbara, Ana Afonso e Isabel Carvalho, por todos os momentos de lazer, por todas as conversas, pela ajuda científica e por me terem compreendido e ajudado.

À Dona Conceição e ao Daniel, todo o apoio prestado ao longo da execução laboratorial.

À Gabriela Moreira, amiga e colega do Mestrado, um enorme obrigado por toda a ajuda laboratorial, pelas palavras de coragem e incentivo que se tornaram imprescindíveis para continuar a caminhar. Muito obrigada por tudo mesmo, do fundo do coração.

À Carla Ferreira, a minha melhor amiga, pela amizade que construímos e por todo o apoio, coragem e força com que me presenteias frequentemente. Sabes que para mim és uma marca de força e determinação e é com muito orgulho que te tenho no topo das amizades.

Aos colegas do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, Ana Maria, Inês, Jaime, Marilene, Stephanie, Sérgio, Rui, Joana, Filipa e Gabriela, agradeço o convívio, os conhecimentos farmacêuticos que partilharam e amizade que consegui travar com muitos deles.

Às meninas da Residência Universitária do Campo Alegre, em especial à Liliana, pelas noites divertidas, pelos vídeos do Raminhos, pelas conversas e pela noite dentro e pela sua amizade que espero que continue para além da vida académica.

Ao núcleo da coordenação da catequese, Graça, Isabel e Joaquina por me ensinarem que a idade é independente da juvenilidade, que a alegria contagiante de viver se conquista com sabedoria e por todo o miminho que dão à vossa “Barbara Guimarães”. Sei que posso contar sempre convosco nesta caminhada da fé que todas estamos envolvidas.

À Joaquina Lemos, em particular, por toda a compreensão e carinho que me dá. A nossa amizade já perdura há alguns anos e são momentos como estes que a fortalecem. Agradeço do fundo do coração o título de “filha que nunca tive” e tento retribuir com o título de “mami”, pois é uma referência na minha vida.

Aos meus pais e ao meu irmão, Maria Ferreira, Joaquim Ferreira e Nuno Ferreira, um especial agradecimento por me terem aturado nestes momentos complicados da escrita da dissertação e por serem o meu pilar. A vós tudo vos devo. Obrigada por estarem sempre presentes.

A Ti, que todos os dias me davas a força necessária para superar mais um dia. Agradeço todas as vezes que pela Tua misericórdia colocaste todas estas pessoas, acima citadas, na minha vida ao longo deste ano, para me dar um incentivo, uma palavra reconfortante e muitas das vezes só pelo facto de estarem lá. És a minha vida e o meu sustento, Graças te dou.

Resumo

O glioma, o cancro que resulta de um crescimento descontrolado das células gliais apresenta uma taxa de sobrevivência muito baixa. A sua terapêutica apresenta um problema acrescido, que é a pequena capacidade do fármaco atingir o sistema nervoso central, devido à presença da barreira hematoencefálica. O paclitaxel é um fármaco anticancerígeno utilizado no tratamento de diversos cancros como, do ovário, mama, pulmão, cólon, bexiga, esófago, cabeça e pescoço, mieloma múltiplo e sarcoma de Kaposi. O seu mecanismo de ação envolve o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M por estabilização dos microtúbulos. O Taxol[®] que foi a primeira forma farmacêutica comercializada contendo este fármaco surgiu após grande investigação para escolher o melhor veículo atendendo à sua principal limitação, que era a baixa solubilidade em meio aquoso. Contudo, devido à toxicidade do próprio fármaco e ao principal excipiente do Taxol[®] (Chremophor EL), continuam-se a procurar alternativas para veicular o paclitaxel. As nanopartículas lipídicas, SLN e NLC, são uma potencial alternativa de administração terapêutica devido à sua capacidade de vetorizar uma grande variedade de fármacos (como por exemplo o paclitaxel) em doses ideais, resultando num efeito terapêutico elevado, efeitos colaterais baixos e maior adesão do paciente à terapêutica. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas lipídicas com paclitaxel para o tratamento do glioma.

A preparação das SLN e das NLC foi otimizada com vista a escolher um método de preparação e uma formulação farmacêutica adequada. Escolhidas as condições, as SLN e as NLC com e sem paclitaxel foram analisadas com base no tamanho da partícula, morfologia, potencial zeta, eficácia de incorporação e estrutura interna. A estabilidade das formulações foi estudada ao longo do tempo, o tamanho da partícula e potencial zeta (90 dias), eficácia de incorporação (30 dias) e estrutura interna (60 dias). O método do doseamento do paclitaxel foi validado, para a especificidade, a precisão e a linearidade e a amplitude de trabalho foi estabelecida.

O doseamento do paclitaxel é linear, específico e apresenta repetibilidade. A incorporação do paclitaxel nas SLN e NLC não alterou o seu tamanho mediano (± 200 nm), bem como o potencial zeta e morfologia. As SLN e as NLC não apresentaram diferenças na eficácia de incorporação (cerca de 50%). Relativamente à estabilidade, as NLC demonstraram ser mais estáveis que as SLN para veicular o paclitaxel durante pelo menos 30 dias.

Palavras- chave: glioma, paclitaxel, nanopartículas, SLN e NLC

Abstract

Glioma, the cancer that results from uncontrolled growth of glial cells presents a very low survival rate. This therapy presents a major problem, which is the small capacity of drug to reach the central nervous system, due to the presence of the blood-brain barrier. Paclitaxel is an anticancer drug used in the treatment of several cancers such as breast, lung, ovary, colon, bladder, esophagus, head and neck, multiple myeloma and Kaposi's sarcoma. Its mechanism of action involves blocking the cell cycle in G2/M phase for stabilization of microtubules. The Taxol[®], which was the first commercial drug containing paclitaxel, came after major investigation to choose the best vehicle to overcome its main limitation, the low solubility in aqueous media. However, due to the toxicity of the drug itself and the main excipient of Taxol[®] (EL Chremophor), alternatives to incorporate the paclitaxel are still being sought. The lipid nanoparticles, SLN and NLC, are a potential alternatives to therapy administration due to its ability to vectorize a wide range of drugs (e.g. paclitaxel) in ideal doses, resulting in a high therapeutic effect, lower side effects and greater patient compliance to therapy. Therefore, the main goal of this project was to develop lipid nanoparticles containing paclitaxel for glioma treatment.

The preparation of SLN and NLC was optimized in order to choose a method of preparation and the best pharmaceutical formulation. Next, paclitaxel loaded- SLN and NLC were analyzed based on the particle size, morphology, zeta potential, efficacy of incorporation and internal structure. The stability of formulations was studied over time, the particle size and zeta potential (90 days), efficacy of incorporation (30 days) and internal structure (60 days). The paclitaxel assay method was validated for specificity, precision and linearity and range of work has been established.

Paclitaxel assay method is linear, and presents specific and repeatability. The incorporation of paclitaxel in the SLN and NLC did not change its size average (± 200 nm), as well as the zeta potential and morphology. The SLN and NLC showed no differences in the efficacy of incorporation (about 50%). As stability regards, the NLC have proven more stable than the SLN to incorporate the paclitaxel for at least 30 days.

Keywords: glioma, paclitaxel, nanoparticles, SLN and NLC

Lista de Abreviaturas

BHE - Barreira hematoencefálica

BSC - *Biopharmaceutic system classification* - Sistema de classificação biofarmacêutica

CrEL - Chremophor EL

Cryo SEM – *Cryogenic Scanning Electron Microscopy* – Microscopia eletrônica de varrimento criogénica

DLS – *Dynamic Light Scattering* – Dispersão dinâmica da luz

DSC - *Differential Scanning Calorimetry* - calorimetria diferencial de varrimento

EI – Eficácia de incorporação

FDA - *Food and Drug Administration*

HAP – Homogeneização a alta pressão

HAV – Homogeneização a alta velocidade

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência

IP – Índice de Polidispersão

IR – Índice de Recristalização

k' – Fator de retenção

Laser - Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation,

LD – *Laser Diffraction* – Difração Laser

NLC – *Nanostructured lipid carriers* -Vetores lipídicos nano-estruturados

NPs - Nanopartículas

PTX – Paclitaxel

PZ – Potencial zeta

SLN - *Solid lipid nanoparticles* - Nanopartículas lipídicas sólidas

SNC- Sistema Nervoso Central

t'_R – Tempo de retenção ajustado

t_0 – Tempo morto

t_R – Tempo de retenção

Índice Geral

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Cancro.....	1
1.1.1	Glioma	2
1.2.	Paclitaxel	3
1.2.1	Considerações gerais	3
1.2.2	Farmacocinética.....	5
1.2.3	Mecanismo de ação	6
1.2.4	Formulações comercializadas	8
1.3.	Nanopartículas	10
1.3.1	Nanopartículas lipídicas	11
1.3.2.	As NPs no tratamento do glioma	14
1.4.	Objetivo do trabalho	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1.	Material e reagentes.....	18
2.2.	Métodos	18
2.2.1	Doseamento do paclitaxel	18
2.2.2	Preparação das nanopartículas.....	22
2.2.3	Caracterização físico-química das nanopartículas	25
2.2.4	Eficácia de incorporação do paclitaxel	29
2.2.5	Calorimetria diferencial de varrimento	30
2.2.6	Estabilidade	31
2.2.7	Análise estatística	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1.	Doseamento do Paclitaxel	33
3.2.	Caracterização das Nanopartículas	40
3.2.1	Tamanho de partícula	40
3.2.2	Potencial zeta	46

3.2.3	Morfologia das partículas	46
3.3.	Eficácia de incorporação do paclitaxel	47
3.4.	DSC.....	48
3.5.	Estabilidade.....	52
4	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	63
5	ANEXOS	65
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa do mundo demonstrando a mortalidade devida ao cancro em ambos os sexos [8].....	2
Figura 2: Estrutura química do paclitaxel (ChemBioDraw 13.0, ChemACX.com).	3
Figura 3: Estrutura química do esqueleto do taxano. Adaptado [18].....	4
Figura 4: Farmacocinética plasmática do paclitaxel.....	6
Figura 5: Equilíbrio dinâmico dos microtúbulos. Adaptado de [46].....	7
Figura 6: Mecanismo de ação do paclitaxel. Adaptado de [35].....	8
Figura 7: Representação ilustrativa das NPs de albumina contendo PTX (Abraxane™). Adaptado de [66].....	9
Figura 8: Ilustração do tamanho de diferentes partículas, realçando o tamanho das nanopartículas (amarelo).	11
Figura 9: Formas de incorporação da substância ativa nas SLN. Adaptado de [79].	12
Figura 10: Diferenças entre a estrutura lipídica cristalina “praticamente perfeita” das SLN (a) e a estrutura lipídica com bastantes imperfeições das NLC (b). Adaptado de [79].	13
Figura 11: Modelos teóricos para a descrição da estrutura e modo de incorporação da substância ativa nas NLC.....	14
Figura 12: Representação esquemática, ilustrando a organização estrutural básica da BHE. Adaptado de [98].....	15
Figura 13: Permeabilidade e retenção aumentada (Efeito EPR) e transporte passivo. Adaptado de [113].....	17
Figura 14: Cromatograma e suas características. t_R - tempo de retenção; t_0 - tempo morto; t'_R - tempo de retenção ajustado; I - largura do pico; A - altura do pico. Adaptado de [130].....	19
Figura 15: Aparelho de HPLC, <i>Ultimate 3000</i> , Thermo scientific DIONEX e coluna <i>Mediterranea sea</i> 18 (3 μ m 10x 0,46), Teknokroma.	21
Figura 16: Esquema resumido das etapas de preparação das nanopartículas.....	22
Figura 17: Homogeneizador de alta velocidade (Vibro Cell VCX 130, Sonics & Materials).	24
Figura 18: High Pressure Homogenizer SPCH-10, Stansted Fluid Power.	25
Figura 19: Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument (à esquerda) e ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville, NY(à direita).....	25
Figura 20: Diagrama esquemático do mecanismo da determinação do tamanho de partícula por DLS [147].	26

Figura 21: Diagrama esquemático do mecanismo da determinação do tamanho de partícula por LD [147].	27
Figura 22: Aparelho de DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH.	31
Figura 23: Representação gráfica do fator de retenção em função da percentagem de metanol da fase móvel.	35
Figura 24: Espectro de absorção do paclitaxel.	36
Figura 25: Cromatograma do Paclitaxel.	36
Figura 26: Representação gráfica do cromatograma do PTX evidenciando 3 pontos distintos do seu pico e dos espectros de absorção em cada ponto.	37
Figura 27: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,9146x - 0,2393$; $R^2 = 0,9974$ e $SQD = 0,0044$. Esta curva de calibração foi obtida a partir da média de 3 curvas independentes.	39
Figura 28: Representação gráfica dos desvios à linearidade.	39
Figura 29: Representação gráfica da resposta do detetor em função da concentração.	40
Figura 30: Diâmetro mediano das NPs lipídicas preparadas por dois métodos distintos (HAV – Homogeneização a alta velocidade; HAP- homogeneização a alta pressão), a duas percentagens de lípido e a 13500 rpm de homogeneização.	41
Figura 31: Diâmetro mediano das NPs lipídicas preparadas por dois métodos distintos (HAV – Homogeneização a alta velocidade; HAP- homogeneização a alta pressão), com 5% de lípido e a 13500 rpm de velocidade de homogeneização.	42
Figura 32: Diâmetro mediano das NPs lipídicas preparadas com duas velocidades de homogeneização diferentes, com 5% de lípido e por HAP (homogeneização a alta pressão).	43
Figura 33: Tamanho mediano das SLN e SLN contendo PTX, determinado pela técnica de LD. $p = 0,099$.	44
Figura 34: Tamanho mediano das NLC e NLC contendo PTX, determinado pela técnica de LD. $p = 0,120$.	44
Figura 35: Diâmetro médio das SLN e SLN contendo PTX, determinado pela técnica de DLS. $p = 0,197$.	45
Figura 36: Diâmetro médio das NLC e NLC contendo PTX, determinado pela técnica de DLS. $p = 0,580$.	46
Figura 37: Imagens das NPs obtidas por CrioSEM. A- SLN vazias, B- SLN-PTX, C- NLC vazias e D- NLC- PTX.	47
Figura 38: Eficácia de incorporação do PTX nas SLN e NLC. $p = 0,699$.	48
Figura 39: Termograma das SLN e seus constituintes.	49
Figura 40: Termograma das SLN-PTX e seus constituintes.	50
Figura 41: Termograma das NLC e dos seus constituintes.	50

Figura 42: Termograma das NLC- PTX e dos seus constituintes.	51
Figura 43: Diâmetro médio das SLN vazias ao longo do tempo, determinado por DLS. p> 0,05.....	52
Figura 44: Diâmetro médio das SLN com PTX ao longo do tempo, determinado por DLS. p> 0,05.....	53
Figura 45: Diâmetro médio das NLC ao longo do tempo, determinado por DLS.....	53
Figura 46: Diâmetro médio das NLC-PTX no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por DLS. p> 0,05.....	54
Figura 47: Diâmetro mediano das SLN no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.	55
Figura 48: Diâmetro mediano das SLN-PTX no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.	55
Figura 49: Diâmetro mediano das NLC no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.	56
Figura 50: Diâmetro mediano das NLC-PTX no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.	56
Figura 51: Potencial zeta das SLN dia 0, 30, 60 e 90. p >0,05.	58
Figura 52: Potencial zeta das SLN- PTX dia 0, 30, 60 e 90. p >0,05.	58
Figura 53: Potencial zeta das NLC dia 0, 30, 60 e 90. p >0,05.	59
Figura 54: Potencial zeta das NLC-PTX dia 0, 30, 60 e 90.....	59
Figura 55: Eficácia de encapsulação do paclitaxel nas SLN no dia da preparação (dia 0) e após 30 dias. p= 0,460.....	61
Figura 56: Eficácia de encapsulação do paclitaxel nas NLC no dia da preparação (dia 0) e após 30 dias. p= 0,732.....	62
Figura 57: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y= 0,8005x - 0,0902$; $R^2= 0,9993$ e $SQD=0,0019$	66
Figura 58: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y= 1,0982x - 0,6406$; $R^2= 0,9961$ e $SQD= 0,014$	66
Figura 59: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y= 0,9367x - 0,1883$; $R^2= 0,9982$ e $SQD= 0,0067$	67
Figura 60: Termograma das SLN no dia 0, 15 e 60.....	69
Figura 61: Termograma das SLN-PTX no dia 0, 15 e 60.....	69
Figura 62: Termograma das NLC no dia 0, 15 e 60.....	70
Figura 63: Termograma das NLC-PTX no dia 0, 15 e 60.....	70

Índice de tabelas

Tabela 1: Exemplo de fármacos classificados segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica [30].....	5
Tabela 2: Diferenças entre uma farmacocinética linear e uma não linear [33].	5
Tabela 3: Exemplos de sistemas de vectorização contendo paclitaxel em desenvolvimento.	10
Tabela 4: Condições cromatográficas para o doseamento do PTX.	20
Tabela 5: Formulações das NPs.	23
Tabela 6: Condições do método da difração laser.....	28
Tabela 7: Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria) para diferentes volumes de injeção (10, 20, 30 e 40 μL). Fase móvel 80/20% (v/v) (metanol/água).....	34
Tabela 8: Precisão das áreas dos picos do PTX de 3 ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade).	38
Tabela 9: Condições estudadas para a preparação de NPs.....	41
Tabela 10: Registo dos parâmetros (início do ponto de fusão, entalpia e índice de recristalização) da análise da DSC, das matérias-primas e formulações.....	49
Tabela 11: Registo dos parâmetros da análise de DSC para as diferentes formulações, ao longo do tempo.	60
Tabela 12: Registo do tamanho mediano e médio (D_v e D_M , respetivamente), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (PZ) e eficácia de encapsulação (EE).	68

1 INTRODUÇÃO

1.1. Cancro

As células normais de um ser humano coexistem em perfeita harmonia citológica, histológica e funcional. De acordo com a sua morfologia e função, as células organizam-se em tecidos e estes em órgãos. Muitas células do organismo humano dividem-se e crescem (ciclo celular) a fim de repovoar tecidos e órgãos (por exemplo, camada basal da pele e as células que compõe a camada epitelial dos intestinos) e manter a saúde do organismo [1].

Tendo em consideração que ocorrem cerca de 10^{12} divisões diárias, este processo, bem como a morte celular programada, apoptose, são cuidadosamente controlados por mecanismos moleculares. Apesar de todos os mecanismos de regulação, podem ocorrer erros que levam a um crescimento celular descontrolado, dando origem a uma massa celular anormal, designada de tumor [1, 2]. Este resulta da alteração da expressão de proto-oncogenes, envolvidos na indução da proliferação celular e diferenciação, e de genes supressores tumorais, envolvidos na produção de sinais inibitórios do crescimento celular e/ou que estimulam a apoptose. Assim, os proto-oncogenes são ativados, quando deveriam estar inativos, e os genes supressores de tumores são expressos incorretamente ou até nem se chegam a expressar. A alteração da expressão destes genes deve-se a danos no ADN, devido a mutações que podem ser espontâneas, devido a erros na sua replicação, ou devido a agentes carcinogénicos exógenos, como algumas substâncias químicas (por exemplo alguns dos componentes do tabaco), agentes infecciosos, radiação ionizante e radiação ultravioleta [1-4].

Os tumores podem ser classificados em benignos e malignos, consoante a sua capacidade de se disseminarem para outros tecidos. Os tumores benignos, não são detentores da capacidade de propagação para outros tecidos, sendo, geralmente, removíveis por cirurgia. Os tumores malignos, ao contrário dos benignos são designados por cancro. Possuem a capacidade de invadir e danificar os tecidos/órgãos adjacentes e ainda atingirem tecidos/órgãos mais distantes por atingirem a circulação sanguínea ou o sistema linfático, originando assim metástases [3, 5].

O cancro leva à morte de milhões de pessoas em todo o mundo (Figura 1). De acordo com os dados obtidos pelo projeto GLOBOCAN em 2012, Organização Mundial de Saúde (OMS), existiram 14,1 milhões de novos casos de cancro, 8,2 milhões mortes e

32,6 milhões de pessoas vivem com esta doença (em 5 anos de diagnóstico) e é expectável que o número de novos casos de cancro anuais aumente para 22 milhões nos próximos 20 anos [6, 7].

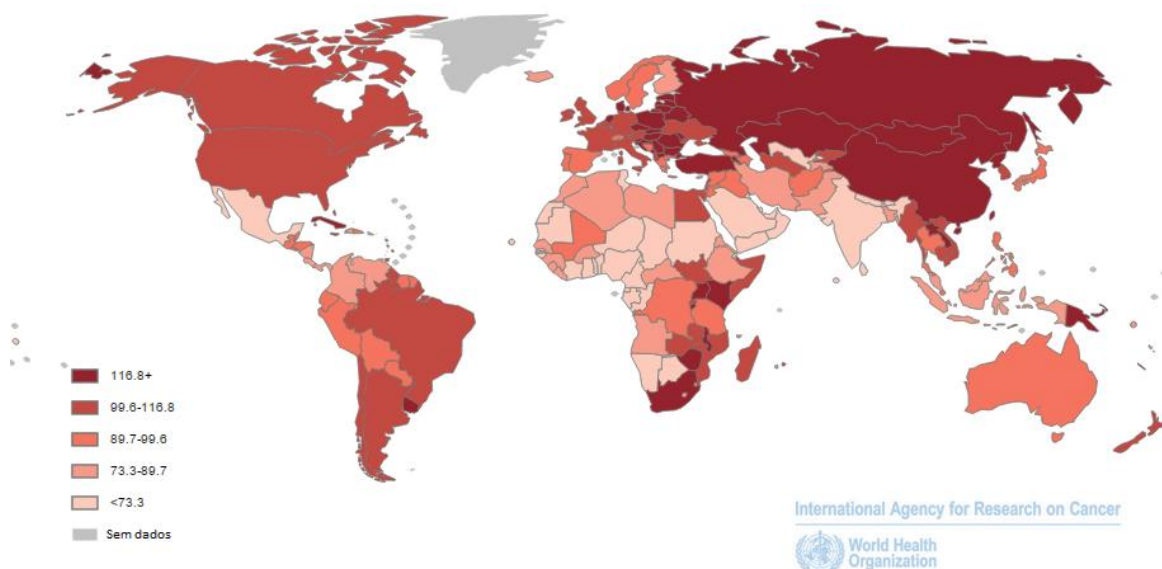


Figura 1: Mapa do mundo demonstrando a mortalidade devida ao cancro em ambos os sexos [8].

Existem mais de 100 tipos diferentes de cancro e a maior parte deles são denominados de acordo com o órgão ou tipo de célula onde têm origem [5].

1.1.1 Glioma

O sistema nervoso central (SNC) é constituído pelo encéfalo e pela medula espinal. O encéfalo é o centro do controlo do corpo e a espinal medula é um veículo de transmissão de informação, leva informação a todos os órgãos do corpo, enviada pelo encéfalo e transmite a este a informação recolhida nos vários órgãos. Estes são constituídos por dois grupos celulares, neurónios e células da glia. Os neurónios são a unidade básica do sistema nervoso e as células da glia protegem, nutrem e dão suporte aos neurónios. No grande grupo de células gliais, existem os astrócitos, os oligodendrócitos, as células endoteliais e a microglia [9].

Os gliomas resultam de um crescimento descontrolado das células gliais e constituem cerca de metade de todos os tumores cerebrais malignos. A classificação OMS divide os gliomas conforme o grau de malignidade, sendo o grau I e II de baixa malignidade e o III e IV de elevada malignidade, sendo estes últimos os mais prevalentes

(cerca de 75%) [10, 11]. O glioblastoma é o glioma mais frequente, de grau IV [12, 13] e constitui cerca de 33% dos tumores cerebrais, o que faz com que tenham alta relevância clínica [14].

São vários os anticancerígenos que atingem o SNC em quantidades insignificantes, devido essencialmente, à presença da Barreira hematoencefálica (BHE) (descrita com pormenor mais adiante). O Paclitaxel é um desses fármacos e apesar de ser utilizado no tratamento de inúmeros cânceres, a sua principal formulação (Taxol®) apresenta inúmeras desvantagens nesse tipo de tratamento para o qual se encontra indicado.

1.2. Paclitaxel

1.2.1 Considerações gerais

O Paclitaxel (PTX) foi isolado por volta de 1960 da casca da árvore do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, em 1969 foi obtido na sua forma pura e em 1971 foi publicada a sua estrutura (Figura 2) [15-19].

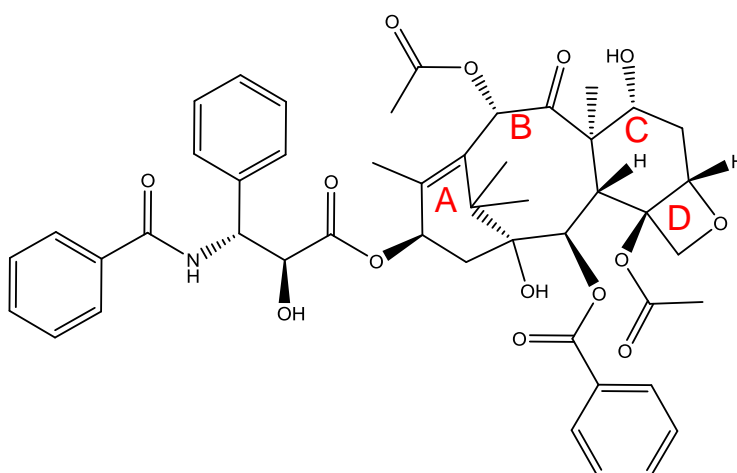
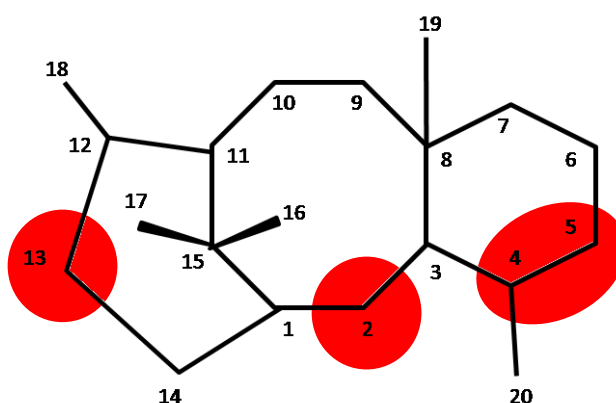


Figura 2: Estrutura química do paclitaxel (ChemBioDraw 13.0, ChemACX.com).

O PTX tem o seguinte nome químico 4,10-Diacetato de 2-benzoato 13- [(2R,3S) -3 (benzoílamino)-2-hidroxi-3-fenilpropanoato] de 5-β,20-epoxi-1,7-β-di-hidroxi-9-oxotax-11-eno-2-α,4,10-β,13-β-tetraílo, a fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e massa molecular de 853,9 Da. Tem um ponto de fusão 216 - 217°C e logP de 3 [15, 18, 20-23].

O PTX é um composto diterpenóide que contém um anel taxano como núcleo (Figura 3), sendo o primeiro da família dos taxanos a ser testado em ensaios clínicos e a ser aceite pela *Food and Drug Administration* (FDA) [18, 24]. Tem o código ATC L01CD, pertencente ao grupo dos agentes antineoplásicos e imunomoduladores [25]. O PTX é

O PTX é um composto diterpenóide que contém um anel taxano como núcleo (Figura 3), sendo o primeiro da família dos taxanos a ser testado em ensaios clínicos e a ser aceite pela *Food and Drug Administration* (FDA) [18, 24]. O PTX é utilizado no tratamento de vários cânceres como o do ovário, mama, pulmão, cólon, bexiga, esófago, cabeça e pescoço, mieloma múltiplo e sarcoma de Kaposi [24, 26-28]. A ação anticancerígena deste fármaco prende-se principalmente na presença da cadeia lateral sob a forma de éster (localizada no carbono 13 do anel taxano), o grupo benzoílo (C2) e o anel oxetano (C4 e C5, anel D - Figura 2) [27].



O PTX apresenta-se como um pó cristalino de cor branca, altamente lipófilo, praticamente insolúvel em água (0,03 mg/mL) e não possui grupos funcionais que possam ser ionizados, por alteração do pH, a fim de aumentar a solubilidade [20, 27]. É um fármaco pertencente à classe IV, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BSC) [21, 22, 29]. O BSC classifica os fármacos tendo em conta dois parâmetros, solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, que são fundamentais para determinar a biodisponibilidade oral (Tabela 1) [30-32]. A classe IV define-se como a classe que caracteriza os fármacos com baixa solubilidade e baixa permeabilidade, sendo por isso difícil a administração do PTX por via oral [33].

Tabela 1: Exemplo de fármacos classificados segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica [31].

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Exemplos
I	Alta	Alta	Propranolol
II	Baixa	Alta	Carbamezapina
III	Alta	Baixa	Captopril
IV	Baixa	Baixa	Paclitaxel

1.2.2 Farmacocinética

A farmacocinética é a área que estuda o que acontece a uma substância após a sua administração, envolve o estudo das cinéticas de absorção, distribuição, metabolização e excreção do fármaco. A farmacocinética de um fármaco pode ser linear ou não linear [34]. As diferenças encontram-se listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Diferenças entre uma farmacocinética linear e uma não linear [34].

Farmacocinética linear	Farmacocinética não linear
Independente da dose ou da concentração do fármaco	Dependente da dose ou da concentração do fármaco
A absorção, distribuição e eliminação do fármaco seguem uma cinética de 1ª ordem	Pelo menos um dos processos farmacocinéticos (absorção, distribuição ou eliminação) é saturável
Todos os parâmetros farmacocinéticos, depuração, volume de distribuição e tempo de semivida, são constantes e independentes da concentração do fármaco	Pelo menos um dos parâmetros farmacocinéticos é dependente da concentração do fármaco
A alteração na dosagem provoca uma alteração proporcional na concentração do fármaco	A alteração na dosagem provoca uma alteração desproporcional na concentração do fármaco

O perfil farmacocinético do PTX é considerado não linear [35] (Figura 4). Com o aumento da dose, há um aumento da concentração máxima plasmática (C_{max}) e AUC, e uma diminuição da depuração e do volume de distribuição e tal facto sugere uma farmacocinética não linear quando o tempo de administração é de 3 h [36]. Na Figura 4 pode-se ver o decréscimo inicial acentuado, que representa a eliminação do fármaco e a distribuição do mesmo para compartimentos periféricos e a fase seguinte é devida, em parte, ao efluxo lento do PTX para compartimentos periféricos [37].

Em termos clínicos, a importância deste perfil não linear é que o aumento da dose pode levar a um aumento desproporcional da toxicidade, e ao invés, a redução da dose pode afetar a sua eficácia [20, 38-40].

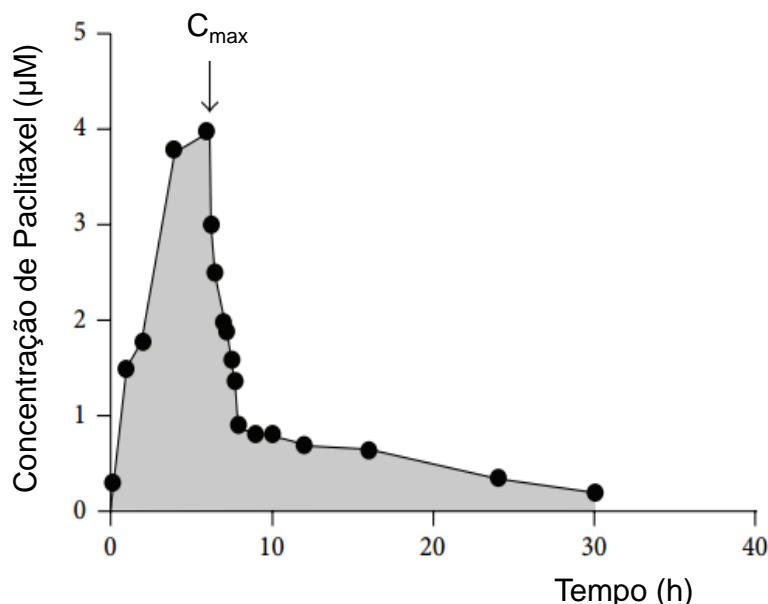


Figura 4: Farmacocinética plasmática do paclitaxel.

A administração do PTX é feita com uma dosagem de 135 ou 175 mg/m² sob a forma de perfusão intravenosa com duração de 3 h ou 24 h, a cada 3 semanas [20, 41]. Uma vez na corrente sanguínea, cerca de 95% do PTX liga-se rápida e extensivamente à albumina sérica [18, 37, 38, 42], ficando apenas cerca de 5% sob a forma livre no plasma [37]. A distribuição é feita para todos os tecidos do corpo, apresentando um grande volume de distribuição, cerca de 55 L/m², sendo contudo a penetração no SNC praticamente insignificante [28, 38]. O PTX sofre extenso metabolismo hepático, mediado pelas enzimas do citocromo P450 [28, 41]. Grande parte do PTX é eliminado nas fezes e menos de 10% é excretada, na sua forma inalterada, na urina, indicando que grande parte da depuração do PTX é fecal e não renal [18, 43].

1.2.3 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do PTX foi descoberto em 1979 [44] e envolve o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M por estabilização dos microtúbulos [45]. Os microtúbulos são estruturas cilíndricas resultado da polimerização dos heterodímeros das subunidades α e β da tubulina, em que quer os microtúbulos quer a tubulina são sintetizados durante a

fase G2 e na prófase da mitose, do ciclo celular. A principal função dos microtúbulos é a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, e para além disso, são necessários para manter a estrutura celular, mobilidade e movimento citoplasmático no interior da célula. Os microtúbulos encontram-se em equilíbrio dinâmico com as subunidades da tubulina, com crescimento rápido preferencial na extremidade (+) e lento na extremidade (-) (Figura 5) [35].

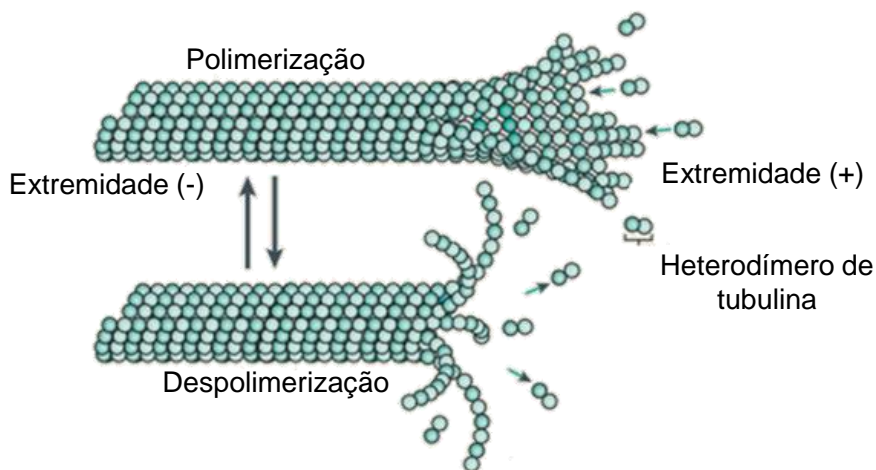


Figura 5: Equilíbrio dinâmico dos microtúbulos. Adaptado de [46].

A cadeia lateral posicionada no C13 da molécula de taxano é a porção ativa do PTX, uma vez que se liga aos microtúbulos, mais concretamente, aos aminoácidos N-terminal da subunidade β da tubulina [35, 47, 48].

Estudos recentes, demonstraram que a baixas concentrações (concentrações inferiores a 1 nM), o PTX inibe a despolimerização dos microtúbulos, ao passo que, a doses elevadas, aumenta o número e a massa dos microtúbulos, aumentando assim a estabilidade dos microtúbulos e também tornando-os não funcionais [49, 50].

O PTX consegue promover a morte celular por mecanismos distintos, dependente da concentração do PTX. Para concentrações superiores ou iguais a 9 nM, o PTX induz a ativação da Raf-1 (proteína de sinalização intracelular responsável pelo controlo apoptótico); para concentrações inferiores a 9 nM, a indução da apoptose ocorre sob influência das proteínas p53 e p21 [51-55].

O PTX, quando administrado semanalmente, apresenta forte atividade inibitória angiogénica [56, 57]. Também tem sido reportada, a indução da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e o aumento da produção de peróxido de hidrogénio resultado da atividade aumentada da NADPH oxidase. O aumento das ROS e de radicais livres contribui para o *stress* oxidativo, que parece potenciar o efeito anticancerígeno do PTX [58, 59]. Os mecanismos de ação do PTX estão sumariados na Figura 6.

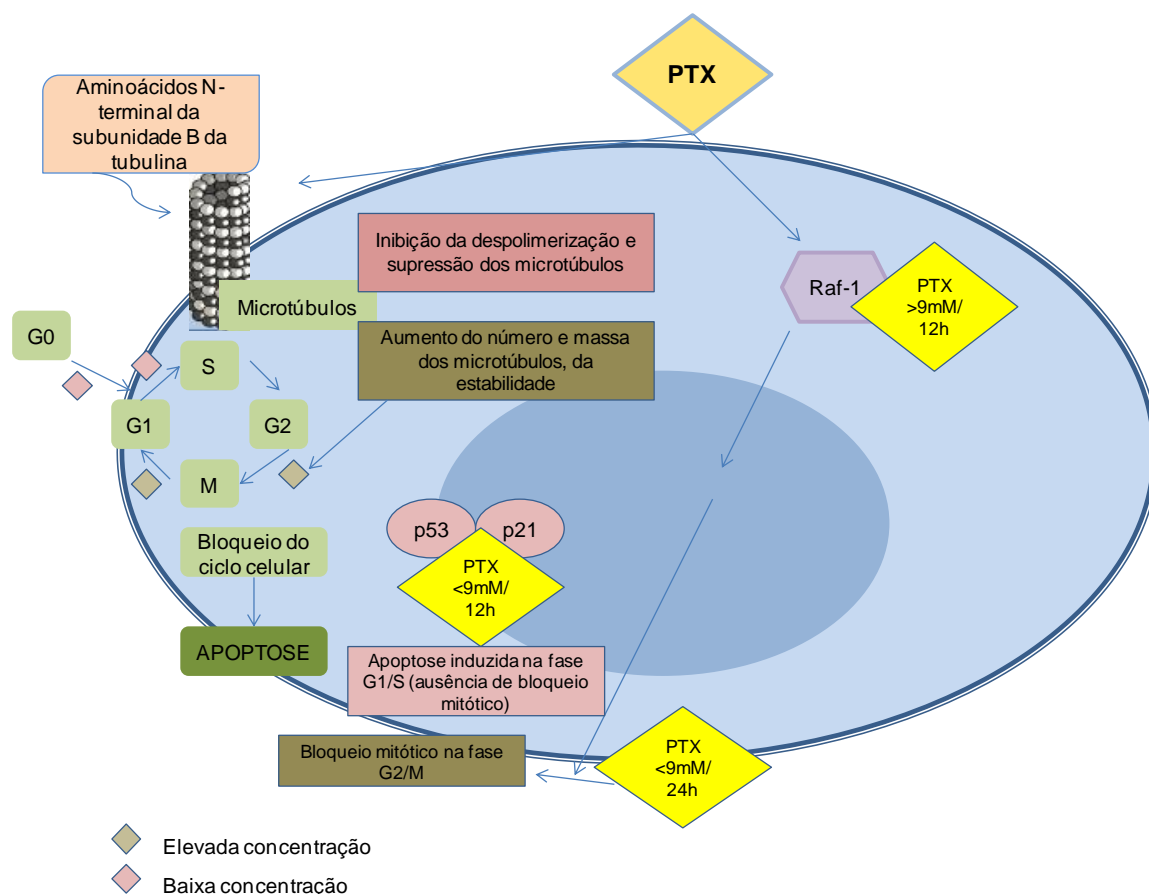


Figura 6: Mecanismo de ação do paclitaxel. Adaptado de [35].

1.2.4 Formulações comercializadas

A primeira formulação clinicamente disponível do PTX foi o Taxol[®]. Foi aprovado pela FDA em 1992 para o tratamento do cancro dos ovários e em 1994 para o tratamento do cancro avançado da mama [35]. Surge após várias investigações para escolher o melhor veículo atendendo à principal limitação do PTX, que era a baixa solubilidade em meio aquoso [27]. O Taxol[®] é formulado numa mistura orgânica (50/50, v/v) de Chremophor EL (CrEL) (óleo de rícino polietoxilado) e etanol diidratado [15-18, 60], para administração intravenosa e apresenta uma baixa biodisponibilidade (6,5%) [61]. O PTX tem efeitos secundários graves como reações de hipersensibilidade severas, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, e neurotoxicidade [16, 17, 62]. Apesar do CrEL ter sido o excipiente escolhido, a sua presença numa formulação para administração intravenosa provoca reações de hipersensibilidade graves e neurotoxicidade [29, 63] e para além disso, altera o perfil farmacocinético do PTX [19, 64, 65]. O tratamento com Taxol[®] requer o uso de pré-medicação, a fim de prevenir as reações de hipersensibilidade, causadas essencialmente pelo CrEL [19] e assim os pacientes são pré-medificados com corticosteroides, como a dexametasona, antagonistas do recetor H1 da histamina, como a difenidramina, e antagonistas do recetor H2 da histamina, como a ranitidina [18, 20].

Face a todos estes problemas, a investigação farmacêutica dedicou-se à descoberta de novas formulações, isentas de CrEL.

O Abraxane™ foi uma alternativa ao Taxol®. Desenvolvido pela Abraxis Bioscience, foi o primeiro produto da tecnologia NAB (*nanoparticles albumin bound*), em que o veículo é a albumina, a ser aprovado pela FDA, em 2005 e está indicado como monoterapia para o tratamento da mama [66]. O Abraxane™ apresenta-se sob a forma de pó, resultado da liofilização de nanopartículas (NPs) de PTX ligadas à albumina (aproximadamente 130 nm de diâmetro [67, 68]) (Figura 7), sendo a sua administração por via intravenosa, após reconstituição. Após a administração, as NPs dissociam-se rapidamente e o complexo PTX-albumina passa a ter aproximadamente 10 nm de diâmetro [69].

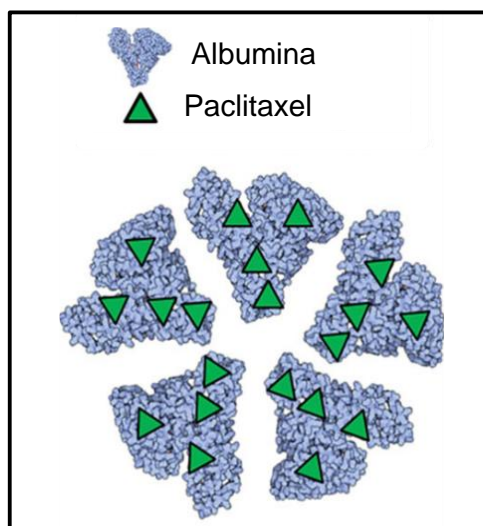


Figura 7: Representação ilustrativa das NPs de albumina contendo PTX (Abraxane™).

Adaptado de [66].

As NPs são preparadas por homogeneização a alta pressão do PTX na presença de 3 - 4% de albumina sérica humana [70]. Nos ensaios clínicos de fase III, demonstrou-se que o Abraxane™ apresenta maior eficácia e segurança relativamente ao Taxol®, para além disso não necessita de pré-medicação [71]. Por exemplo, a administração intravenosa de uma dose de 70 mg/Kg de Abraxane™ não provoca toxicidade, ao passo que menos de metade da dose de Taxol® (30 mg/Kg) provoca.

Para além destas duas formulações que já se encontram no mercado, muitas outras encontram-se sob ensaios clínicos (Tabela 3).

Tabela 3: Exemplos de sistemas de vectorização contendo paclitaxel em desenvolvimento.

Vetor	Nome comercial	Indicação	Estado	Referência
Lipossomas	LEP-ETU	Cancro do pâncreas	Fase II	[72, 73]
	EndoTAG®-1	Cancro da mama HER2-negativo	Fase II	[72, 74]
Micelas	Genexol®-PM	Cancro da mama, pulmão, pâncreas	Fase II	[75, 76]
	NK105	Cancro do estômago	Fase II	[77, 78]
		Cancro da mama	Fase III	[77]
Complexo polímero - fármaco	Opaxio®	Tumores sólidos	Fase III	[79, 80]
	Taxoprexin	Cancro do pâncreas e melanoma	Fase III	[81, 82]

A solução para os problemas relacionados com o PTX e os demais fármacos antineoplásicos, passa pela vectorização, tendo as NPs dado ao longo destes anos provas de serem um potencial vetor.

1.3. Nanopartículas

O desenvolvimento de novos fármacos, hoje em dia, é insuficiente para assegurar progressos nas terapias. Durante o desenvolvimento farmacêutico alguns estudos *in vitro* revelam resultados bastantes satisfatórios, contudo muitos desses fármacos estudados falham em ensaios *in vivo*. Motivos como a baixa solubilidade do fármaco em meio aquoso, a baixa concentração de fármaco no organismo devido ao elevado metabolismo, elevada toxicidade dada a elevada distribuição por órgãos e tecidos e até mesmo a sua baixa solubilidade na formulação justificam as falhas de muitos fármacos em ensaios clínicos [83, 84].

A área superficial de uma partícula está diretamente relacionada com o seu tamanho e com a capacidade de dissolução em meio aquoso. Quanto mais pequena for uma partícula maior será a sua área superficial, como consequência maior será o contacto com o meio que a rodeia [85]. Uma vez que a baixa solubilidade dos fármacos, em meio aquoso, é apontada como um fator limitante no desenvolvimento de novos medicamentos, a possibilidade de incorporar o fármaco dentro de partículas de tamanho reduzido (na ordem de grandeza dos nanómetros), seria uma possível solução [86],

surgindo assim uma forte investigação em nanopartículas. As NPs são partículas coloidais com diâmetro entre 1 nm a 1 µm (Figura 8) ou outras dimensões (mais restritas), dependendo dos autores [87-89] e podem ser constituídas por vários materiais como polímeros, lípidos, metais, macromoléculas, etc. [90].

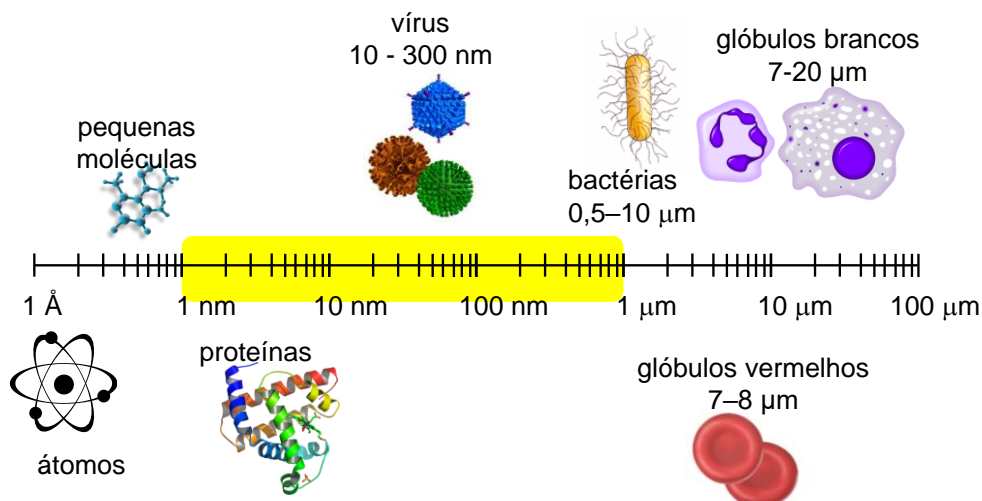


Figura 8: Ilustração do tamanho de diferentes partículas, realçando o tamanho das nanopartículas (amarelo).

As NPs são alvo de inúmera e diversificada investigação em diversas áreas como a saúde humana, entre outras, devido à sua capacidade de vetorizar uma grande variedade de fármacos em doses ideais, resultando num efeito terapêutico elevado, efeitos colaterais baixos e maior adesão do paciente à terapêutica [91].

1.3.1 Nanopartículas lipídicas

1.3.1.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) foram desenvolvidas no início dos anos 90 do século passado como uma alternativa aos lipossomas, às emulsões e às NPs poliméricas. São definidas como um sistema de partículas lipídicas sólidas coloidais com um diâmetro que varia entre os 50 e 1000 nm [92].

As SLN são formadas por lípidos sólidos (lípidos que à temperatura ambiente se encontram no estado sólido) biocompatíveis e biodegradáveis dispersos numa solução aquosa contendo um agente tensioativo (que promove a estabilidade física do sistema). Dependendo do tipo e concentração do lípido utilizado, a percentagem de agente tensioativo varia entre 0,5 a 5%. O poloxâmero 188, polissorbato 80, lecitina, di-estearato de poliglicerol metilglucose, cocoanfoacetato de sódio ou ésteres de sacarose de ácidos

gordos são muito utilizados como agentes tensioativos na preparação de SLN [93]. Os lípidos utilizados nas SLN são triglicéridos (trimiristina), misturas de glicerídeos (Witepsol® E85) ou ésteres (palmitato de cetilo) [89, 94].

As SLN apresentam vantagens relativamente a outros nano-sistemas, nomeadamente em relação às NPs poliméricas por apresentarem menor toxicidade e relativamente às emulsões devido à maior facilidade de controlar a libertação do fármaco [95]. No entanto, também apresentam algumas desvantagens como a baixa capacidade de carga de fármaco, o facto da dispersão de NPs apresentar elevado conteúdo em água (70 a 99,9%) e a possibilidade de ocorrer a expulsão do fármaco, durante o armazenamento. A capacidade de carga depende essencialmente dos seguintes fatores: solubilidade do fármaco no lípido fundido, estrutura da matriz lipídica e estado polimórfico da mesma [84].

Segundo Müller e seus colaboradores [96] as substâncias ativas podem ser vetorizadas nas SLN de três formas distintas como representado na Figura 9.

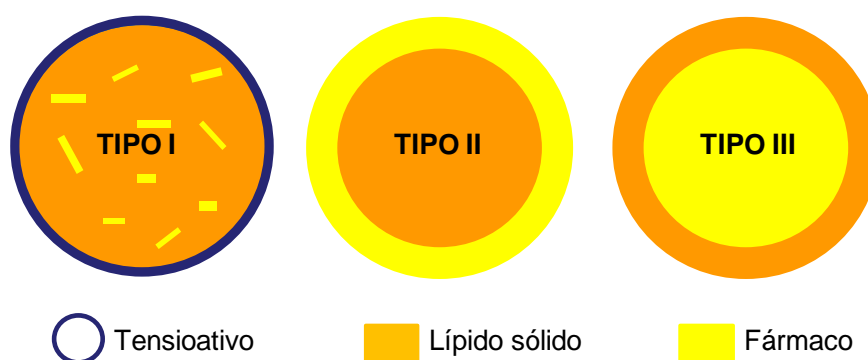


Figura 9: Formas de incorporação da substância ativa nas SLN. Adaptado de [85].

As SLN tipo I representam um modelo que é caracterizado por uma matriz homogénea visto que a substância ativa se encontra molecularmente dispersa no lípido. Devido à sua estrutura, as SLN tipo I são indicados para modificar o perfil de libertação das substâncias ativas [96, 97]. O modelo das SLN tipo II traduz uma parede externa rica em fármaco que envolve um núcleo lipídico. Ao contrário do modelo anterior, este não permite alterar o perfil de libertação do fármaco uma vez que este se encontra na superfície da NP. No entanto, pode ser utilizado para preparar SLN destinadas a administração tópica, visando aumentar a biodisponibilidade do fármaco [97]. O modelo das SLN tipo III é oposto ao das SLN tipo II, uma vez que neste a substância ativa é que precipita em primeiro lugar e não o lípido, e portanto temos um núcleo constituído por substância ativa, rodeado por uma parede lipídica. Este tipo de SLN forma-se nos casos em que durante a preparação pela HAP a quente, a quantidade de fármaco encontra-se

solubilizada no lípido, na sua concentração de saturação, ou próximo desta. Este modelo é útil para obter uma liberação modificada da substância ativa definida pela lei de difusão de Fick [96, 97].

1.3.1.2 Vetores lipídicos nano-estruturados

Anos mais tarde, surgiram os vetores lipídicos nano-estruturados (NLC), que constituem a segunda geração de nanopartículas lipídicas e têm como objetivo minimizar as desvantagens associadas às SLN. As NLC diferem das SLN, essencialmente, por possuírem uma matriz nanoestruturada imperfeita cujo objetivo é aumentar a capacidade de encapsulação de fármacos e prevenir a sua expulsão do interior das nanopartículas durante o armazenamento, conferindo maior flexibilidade para modular a sua liberação (Figura 10b) [83, 85].

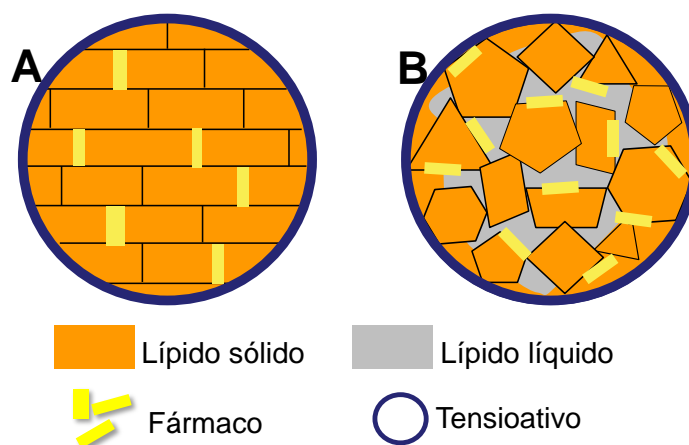


Figura 10: Diferenças entre a estrutura lipídica cristalina “praticamente perfeita” das SLN (a) e a estrutura lipídica com bastantes imperfeições das NLC (b). Adaptado de [85].

A nível de constituintes, as NLC diferem das SLN uma vez que possuem uma mistura de lípidos sólidos e líquidos. É esta diferença de constituintes que justifica a estrutura de cada uma delas, uma vez que apenas com lípidos sólidos as NPs apresentam uma estrutura lipídica muito organizada (Figura 10a).

Tal como acontece com as SLN, também as NLC têm três modelos teóricos que descrevem a estrutura e a incorporação das substâncias ativas (Figura 11).

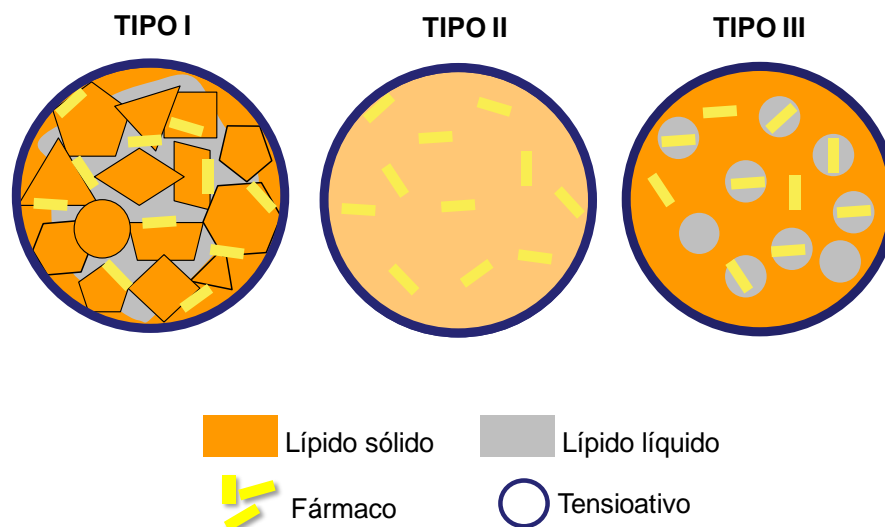


Figura 11: Modelos teóricos para a descrição da estrutura e modo de incorporação do fármaco nas NLC.

As NLC do tipo I, ou modelo de cristal imperfeito, apresentam uma estrutura lipídica desorganizada que permite uma elevada incorporação de substância ativa. Este modelo é obtido quando se misturam lipídios sólidos com pequenas quantidades de lipídios líquidos. A incapacidade da matriz de organizar-se de forma perfeita deve-se ao facto dos lipídios que a constituem terem cadeias de ácidos gordos de diferentes tamanhos e à mistura de mono, di e triglicerídeos. As NLC do tipo II são definidas pelo modelo amorfo, e é obtido quando se misturam certos lipídios (por exemplo: miristato de isopropilo ou adipato de dibutilo), que não recristalizam depois da homogeneização, durante o arrefecimento da nanoemulsão. Estes lipídios originam NPs que apresentam uma menor probabilidade de expulsar a substância ativa durante o armazenamento devido à sua estrutura amorfa. As NLC tipo III traduzem um modelo múltiplo, e podem ser comparadas às emulsões múltiplas do tipo água em óleo em água (A/O/A). Este tipo de NLC é obtido por mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos, numa proporção tal que a solubilidade das moléculas do lipídio líquido no lipídio sólido seja ultrapassada, levando à separação de fases e à formação de pequenos nanocompartimentos de lipídio líquido no meio da matriz lipídica sólida. A maior parte das substâncias ativas lipófilas têm maior solubilidade em lipídios líquidos do que nos sólidos, e por isso a incorporação deste tipo de substâncias pode ser aumentada mediante a utilização deste tipo de NLC [97, 98].

1.3.2 As NPs no tratamento do glioma

O tratamento convencional para o glioma inclui a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia, tal como para os outros cancros [99, 100]. Contudo quer a radioterapia quer a

quimioterapia não surtem os efeitos desejáveis em termos de sobrevivência e resposta ao tratamento [101]. Problemas como neurotoxicidade, falta de especificidade, pouca acumulação de fármaco nos tumores e efeitos secundários graves, limitam o uso do tratamento convencional. Estes problemas são comuns ao tratamento de outros tumores, contudo a terapêutica para o glioma apresenta um problema adicional: a passagem dos fármacos pela BHE [102, 103].

A BHE é uma estrutura dinâmica, complexa e específica que separa o sistema circulatório do SNC (Figura 12) [104]. Esta barreira protege o cérebro das substâncias nocivas e ao mesmo tempo fornece-lhe os nutrientes necessários para o seu funcionamento [105]. Apesar da BHE ser constituída essencialmente por células endoteliais, outras células como os pericitos, astrócitos e células neuronais também fazem parte da BHE [106]. As células endoteliais que compõem a BHE são diferentes das restantes do organismo uma vez que não possuem fenestras, apresentam baixa atividade pinocítica e estão intimamente ligadas por junções que, constituem a primeira linha de controlo a todas as substâncias que entram no SNC [107, 108]. Os dois grandes objetivos desta barreira são a homeostasia cerebral e a neuroprotecção, sendo este último apontado como o principal objetivo [104, 105, 109]. A passagem de substâncias pela BHE é um processo bastante seletivo e depende de certos fatores como, a massa molecular, a lipofilicidade e a conformação das substâncias [105, 110, 111].

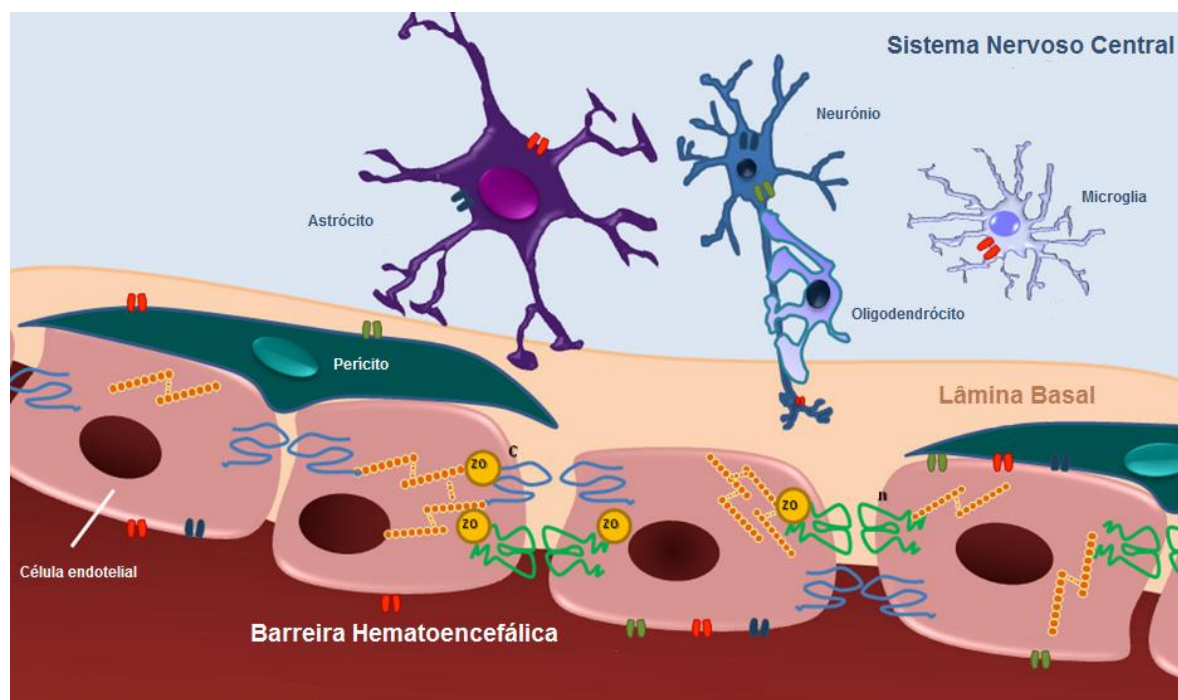


Figura 12: Representação esquemática, ilustrando a organização estrutural básica da BHE. Adaptado de [104].

Perante esta dificuldade dos fármacos conseguirem atravessar a BHE, a procura de soluções foi crescente, uma vez que, a taxa de sobrevivência dos pacientes com glioma é muito baixa. Perante os fatores que determinam se uma substância atravessa ou não a BHE, as NPs foram alvo de inúmeros estudos [112-114]. Estas possuem inúmeras vantagens para aplicação terapêutica, tais como a capacidade de melhorar as propriedades farmacêuticas e farmacológicas dos fármacos, sem a necessidade de alterar a molécula do fármaco; elevada eficácia terapêutica resultante da libertação direcionada dos fármacos às células ou aos tecidos específicos; libertação dos fármacos através de várias barreiras biológicas, incluindo a epitelial e a endotelial; libertação de fármacos para os locais de ação intracelulares; capacidade de libertação de múltiplos tipos de fármacos com propriedades físico-químicas diferentes [115]. Para além de todas estas vantagens, as NPs podem usufruir das características de um tumor. A vascularização dos tumores é heterogênea, tendo regiões de necrose ou hemorragias, assim como regiões em que são densamente vascularizadas a fim de sustentar o adequado abastecimento dos nutrientes e do oxigénio para o rápido crescimento do tecido tumoral (angiogénese) [116]. O endotélio dos vasos sanguíneos tumorais, apresenta fenestras bastante maiores (400 a 700 nm) do que os normais (5 a 7 nm) [117]. Para além desta propriedade, o sistema de drenagem linfática é disfuncional nos tumores, o que resulta numa maior retenção de fluidos no interstício tumoral. Estas características são responsáveis por uma acumulação de NPs no tecido tumoral 100 vezes superior à no tecido normal (Figura 13) chamado efeito EPR (*Enhanced permeability and retention effect*) [118]. Este efeito é de elevada importância, uma vez que é graças a ele que as NPs têm este impacto tão grande na área do cancro.

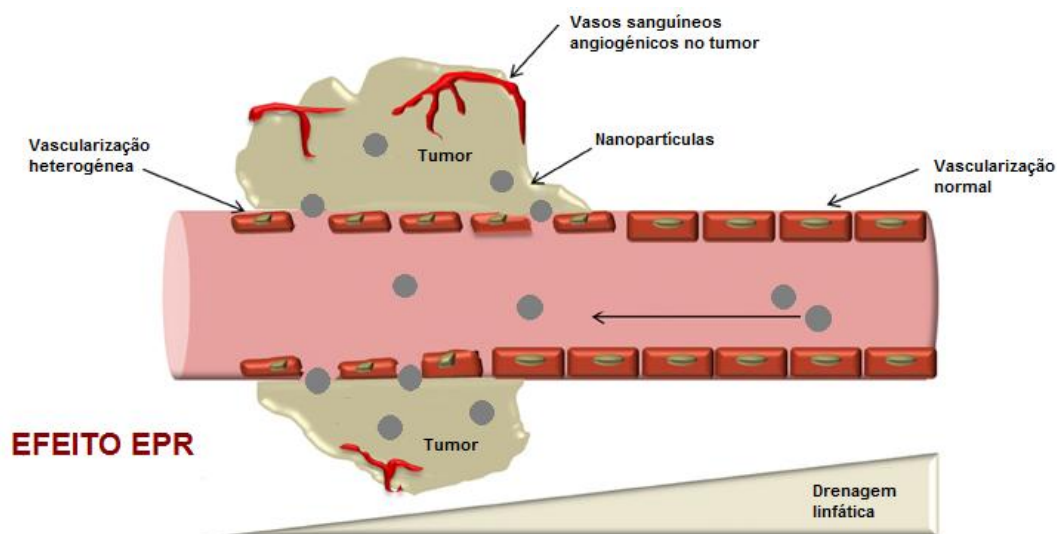


Figura 13: Permeabilidade e retenção aumentada (Efeito EPR) e transporte passivo.

Adaptado de [119].

Face à dificuldade da terapêutica para o glioblastoma, às características de um tumor e às potenciais vantagens do uso das NPs para veicular fármacos, a investigação farmacêutica dedicou-se fortemente a estudar alternativas. Inúmeros estudos foram publicados sobre NPs para o tratamento do glioma [112, 120-130]. Contudo ainda existem poucos estudos com o PTX para o tratamento do glioma usando as NPs como vetor [131-134].

1.4. Objetivo do trabalho

Devido à importância de contornar os problemas associados ao paclitaxel e a dificuldade de atingir o sucesso na terapêutica do glioma, encontrar uma formulação farmacêutica que contorne estes problemas é deveras importante. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver nanopartículas lipídicas com paclitaxel para o tratamento do glioma. Assim diferentes métodos de produção (homogeneização a alta velocidade e a alta pressão), diferentes tipos de nanopartículas (SLN ou NLC), diferentes concentrações de lípidos sólidos (5 e 10 %) e diferentes velocidades de homogeneização (8000 e 13500 rpm) foram testados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material e reagentes

Para a formação das NPs o PTX foi adquirido à MEC-Medchem Express, o palmitato de cetilo foi fornecido gratuitamente pela Gattefossé, o Miglyol 812 foi adquirido à Acofarma, assim como o Tween[®] 80 (monoleato de polioxietilenossorbitano). Nos ensaios de HPLC, foi utilizado metanol (HiPerSolv CHROMANORM), VWR e água ultra pura, obtida no laboratório pelo sistema Direct-Q[®] Ultrapure Water Systems, Millipore.

2.2. Métodos

2.2.1 Doseamento do paclitaxel

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um método de análise quantitativa e é amplamente utilizado para analisar formulações farmacêuticas, fluidos biológicos, polímeros naturais e sintéticos, resíduos ambientais, entre outros. Um sistema de HPLC é composto, essencialmente por quatro componentes fundamentais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna e um detetor, todos conectados em série. A separação cromatográfica das substâncias que compõe a amostra é baseada na interação e partição diferencial entre a fase móvel e a fase estacionária contidas na coluna cromatográfica.

A fase móvel é líquida e passa sob elevada pressão através da coluna, em aço inox com um diâmetro interno de 2-5 mm, empacotada com partículas (geralmente de sílica) de tamanho micrométrico (fase estacionária), para eluir a amostra. Consequentemente, cada soluto é eluído sequencialmente de acordo com a interação que tem com a coluna. Solutos com pouca interação são os primeiros a ser eluídos e solutos que interajam fortemente com a coluna ficaram retidos mais tempo e por conseguinte vão ser eluídos mais tarde. A alta pressão com que passa a fase móvel na coluna, permite análises mais rápidas e o uso de colunas constituídas por micropartículas permite uma elevada eficiência na separação [135, 136].

Os compostos eluídos são transportados pela fase móvel até ao detetor e são registados como sinais (picos). A representação destes sinais em função do tempo em que eles foram detetados, constitui o cromatograma (Figura 14). Os picos presentes no cromatograma dão-nos informações qualitativas e quantitativas acerca da amostra analisada.

Para uma análise qualitativa o parâmetro tempo de retenção é fundamental. O tempo de retenção (t_R) é o tempo entre a injeção da amostra e o registo de um pico e corresponde ao somatório do tempo morto (t_0) e do tempo de retenção ajustado (t'_R). O t_0 é definido como tempo necessário para a fase móvel passar pela coluna, sendo considerado como o tempo de resistência da fase móvel. O t'_R é o tempo de resistência da fase estacionária e varia de composto para composto. A partir destes tempos é possível calcular um outro parâmetro útil deste método, o fator de retenção (k'). Este fator é independente do comprimento da coluna e do fluxo da fase móvel, e representa o rácio dos tempos retidos do composto na fase estacionária e na fase móvel (Equação 1). O seu valor deve estar compreendido entre 1 e 10, sendo que a ICH Guideline recomenda que seja superior a 2 [136].

$$k' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 1: Fator de retenção}$$

Para uma análise quantitativa, os parâmetros área e altura do pico são fundamentais. A curva de calibração é obtida através dos valores de área ou altura do pico em função de concentrações rigorosamente conhecidas [136].

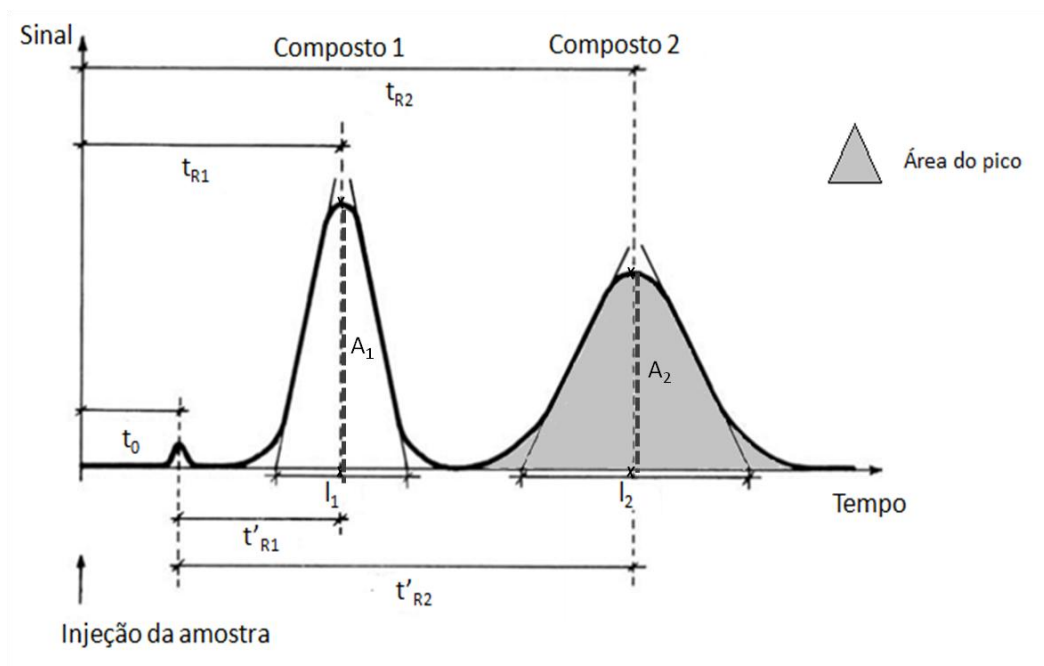


Figura 14: Cromatograma e suas características. t_R - tempo de retenção; t_0 - tempo morto; t'_R - tempo de retenção ajustado; l - largura do pico; A - altura do pico. Adaptado de [136].

O mecanismo de fase reversa é o mecanismo de separação mais utilizado e caracteriza-se por a fase estacionária ser menos polar do que a fase móvel. Este mecanismo baseia-se na partilha de eletrões entre as nuvens eletrónicas das cadeias moleculares da fase estacionária e da substância a separar. Apresenta como uma grande vantagem, o facto de ser económico, uma vez que um dos solventes é a água, e esta é considerada o solvente base [136, 137]. A coluna C18, cujo grupo funcional é octadecil, é muito utilizada neste mecanismo e está indicada para a análise de fármacos, sendo a utilizada neste trabalho [138, 139].

A validação de um método envolve a avaliação de certos parâmetros, como a exatidão, precisão, especificidade, limite de deteção, limite de quantificação, linearidade e amplitude (as definições destes conceitos encontram-se no glossário). Para validar o doseamento de uma substância por HPLC, normalmente, a exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade), especificidade, linearidade e amplitude são os parâmetros estudados. No presente trabalho, a especificidade, a precisão e a linearidade foram os parâmetros estudados.

A solução de PTX foi preparada por dissolução do PTX numa mistura de metanol/água ultra pura, numa proporção de 80%:20%, apresentando uma concentração de 20 µg/mL. Foram testados dois parâmetros cromatográficos, a percentagem dos eluentes e o volume de injeção. Os eluentes selecionados para o doseamento do PTX foram o metanol e água, com base num trabalho publicado [140]. Os volumes de injeção testados foram: 10 µL, 20 µL, 30 µL e 40 µL, sendo o de 30 µL, o volume de injeção escolhido (ver resultados). As proporções dos eluentes, 80:20 % (v/v), 85:15 % (v/v) e 75:25 % (v/v), foram testadas a fim de otimizar o doseamento, sendo a proporção 80/20 a escolhida (ver resultados). Para cada parâmetro testado, a amostra foi injetada 3 vezes. As condições cromatográficas do doseamento do PTX estabelecidas encontram-se listadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições cromatográficas para o doseamento do PTX.

Volume de injeção	30 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Comprimento de onda de deteção	230 nm
Eluentes	metanol: água; 80:20 (v/v)
Temperatura	25°C
Tempo de corrida	7 min

O doseamento do PTX foi feito pelo método de fase reversa utilizando o equipamento *Ultimate 3000*, Thermo scientific DIONEX e a coluna *Mediterranea sea 18* (diâmetro das partículas internas: 3 μm ; dimensões: 10 x 0,46 cm), Teknokroma (Figura 15). Os cromatogramas foram adquiridos pelo programa informático Chromeleon, versão 6.80. A eluição usado foi isocrática, utilizando o metanol e a água ultra pura como eluentes (Tabela 4).

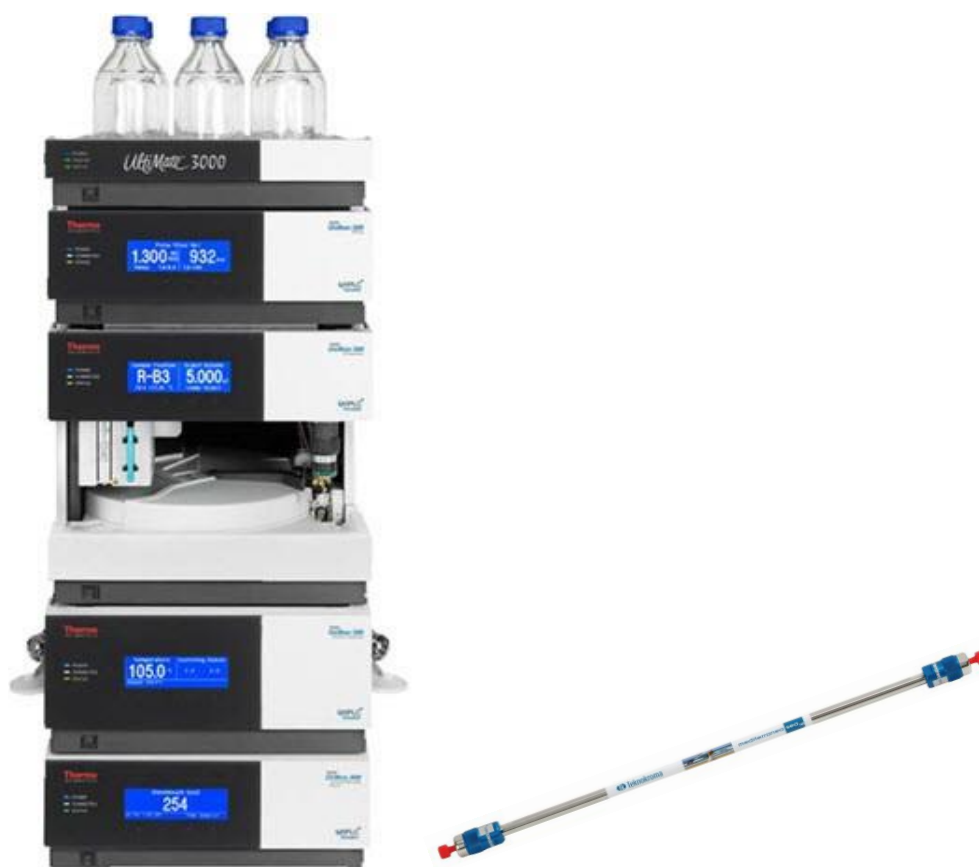


Figura 15: Aparelho de HPLC, *Ultimate 3000*, Thermo scientific DIONEX e coluna *Mediterranea sea 18* (3 μm 10x 0,46), Teknokroma.

A avaliação da linearidade consiste no estabelecimento de uma relação diretamente proporcional entre a concentração de fármaco (neste caso) e a área do pico, o que matematicamente e graficamente se traduz numa curva de calibração. Para a preparação da curva de calibração foram feitas três soluções *stock* independentes com uma concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ de PTX. Os padrões preparados tinham as seguintes concentrações: 1,2 $\mu\text{g/mL}$, 1,6 $\mu\text{g/mL}$, 2,4 $\mu\text{g/mL}$, 2,7 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 3,3 $\mu\text{g/mL}$ e 3,6 $\mu\text{g/mL}$. Os padrões foram injetados por ordem crescente de concentração e cada padrão foi injetado quatro vezes.

2.2.2 Preparação das nanopartículas

A preparação das NPs pode ser geralmente descrita em três etapas: incorporação do fármaco ou composto bioativo, divisão em partículas de pequenas dimensões e a estabilização das partículas formadas na fase anterior, por processos químicos ou físicos [141-143]. A incorporação do fármaco é feita maioritariamente por dissolução, fusão ou emulsificação. A divisão em partículas mais pequenas pode ser feita por emulsificação, atomização e moldagem. Por fim, a estabilização das partículas pode ser feita por evaporação, extração, difusão e substituição do solvente adição de um agente *salting-out*, coacervação, gelificação, etc. (Figura 16). A escolha do método depende das características físico-químicas do fármaco a incorporar nas NPs e da aplicação destinada às NPs [144].

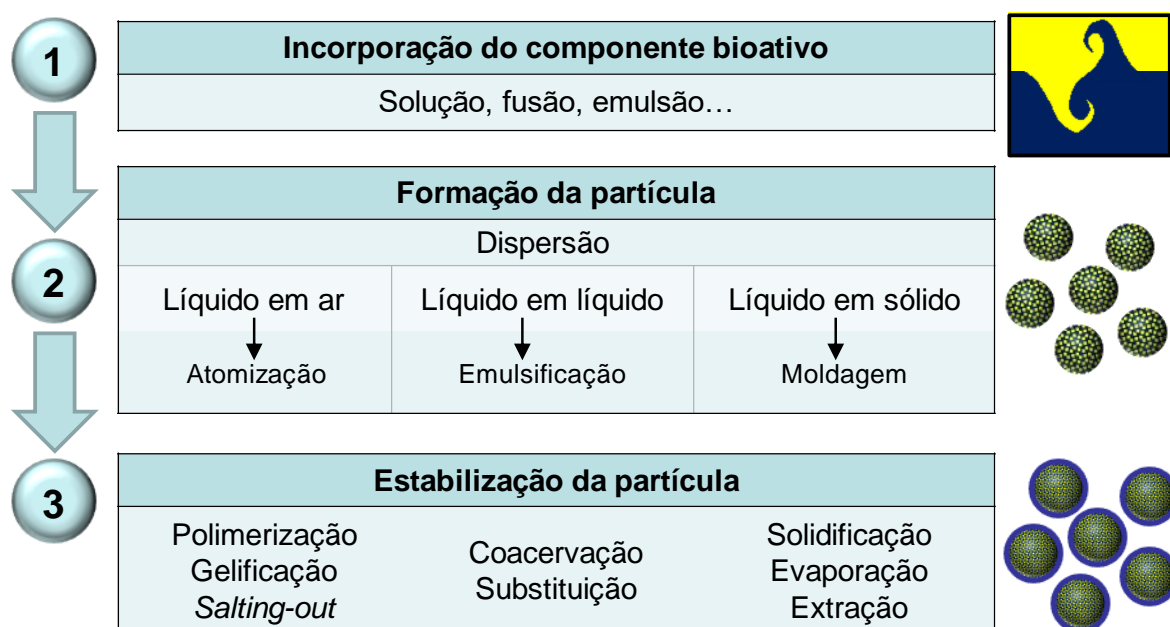


Figura 16: Esquema resumido das etapas de preparação das nanopartículas.

O fármaco foi dissolvido no lípido sólido, ou mistura de lípidos, as NPs formaram-se por emulsificação da fase lipídica na fase aquosa e por fim as NPs foram estabilizadas por solidificação (arrefecimento rápido da dispersão obtida). As NPs foram preparadas por dois métodos, a fim de escolher o melhor para encapsular o fármaco e prosseguir com os ensaios. As formulações testadas (sem PTX) foram as mesmas para ambos os métodos, estando na Tabela 5 as fórmulas das NPs. As percentagens dos componentes das NPs, foram escolhidas com base em trabalhos prévios realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas, Departamento de Ciências do Medicamento da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sendo as condições de preparação

adaptadas dos mesmos [145-147]. O lípido sólido usado foi o palmitato de cetilo, o lípido líquido foi o Miglyol 812 e o agente tensioativo foi o polissorbato 80 (Tween[®] 80), referenciado como um bom tensioativo para direcionamento ao cérebro [148, 149]. Após escolher o método e as percentagens dos componentes para prosseguir os ensaios, o PTX foi incorporado na formulação numa percentagem de 0,1%.

Tabela 5: Formulações das NPs.

	SLN 5%	SLN 10%	NLC 5%	NLC 10%
Lípido Sólido	0,5 g	1 g	0,3 g	0,7 g
Lípido Líquido	-----	-----	0,2 g	0,3 g
Tensioativo	0,2 g	0,4 g	0,2 g	0,4 g
Água	qb 10 g	qb 10 g	qb 10 g	qb 10 g

2.2.2.1 Método da homogeneização a alta velocidade

O método da homogeneização é bastante utilizado na preparação de NPs [146, 147, 150]. O lípido sólido, o tensioativo e o lípido líquido (para a preparação das NLC) foram pesados num tubo de centrífuga e colocados em banho de água, que se encontrava a 70°C. A água ultra pura (Direct-Q[®] Ultrapure Water Systems, Millipore) foi também pesada num tubo de centrífuga e colocada no mesmo banho de água. Após ambas as fases atingirem os 70°C, a água foi transferida para a mistura de lípido (s) e tensioativo. De seguida, procedeu-se à homogeneização da preparação a elevada velocidade no ultra turrax T 25 (IKA Labortechnik) a 13500 rpm durante 30 s. A pré-emulsão obtida foi submetida a homogeneização de alta velocidade (Modelo Vibro Cell VCX 130, sonda de 6 mm, Sonics & Materials) durante 2 min com uma amplitude de 80% (Figura 17). Por fim, a emulsão foi arrefecida em água corrente para que haja uma solidificação rápida das NPs. A dispersão de NPs obtida foi armazenada à temperatura de 4°C.



Figura 17: Homogeneizador de alta velocidade (Vibro Cell VCX 130, Sonics & Materials).

2.2.2.2 Método da homogeneização a alta pressão a quente

A técnica da homogeneização a alta pressão (HAP) foi desenvolvida por Müller e Lucks em 1996 [151]. Esta técnica permitiu resolver alguns problemas apontados na produção de outro tipo de NPs (como as NPs poliméricas), como a dificuldade de transposição de escala, etc. Além disso, apresenta outras vantagens como a obtenção de dispersões de NPs relativamente homogêneas, onde se reflete uma maior estabilidade física da dispersão coloidal, simplicidade de execução e rentabilidade do processo [89, 152]. Os homogeneizadores de alta pressão forçam a amostra a passar num orifício curto e estreito (com poucos micrómetros) a uma pressão elevada (100 - 2000 bar). Assim, a amostra fica sujeita a uma elevada tensão de corte e forças de cavitação que resultam na redução do tamanho das partículas contidas na amostra [94].

O procedimento para a preparação das NPs pelo método da HAP a quente foi igual ao método dos ultrassons, até à etapa da homogeneização de alta velocidade, sendo que nesta foram testados duas velocidades 8000 rpm e 13500 rpm. Após esta homogeneização, a pré – emulsão obtida foi colocado no homogeneizador (High Pressure Homogenizer SPCH-10, Stansted Fluid Power) e sujeita a uma pressão de aproximadamente 1500 bar (Figura 18). Todo o sistema por onde passa a amostra encontrava-se a 70°C, devido a um banho externo que regulava a temperatura do sistema. A amostra foi sujeita à mesma pressão 3 vezes, isto é, foram feitos 3 ciclos [94, 153]. O arrefecimento das NPs constitui também o último passo da preparação e foi feito em água corrente. A dispersão de NPs obtida foi armazenada à temperatura de 4°C.



Figura 18: High Pressure Homogenizer SPCH-10, Stansted Fluid Power.

2.2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

2.2.3.1 Tamanho de partícula

A determinação do tamanho das NPs foi realizada por dois métodos diferentes: difração laser (LD- Laser Diffraction, Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument) e dispersão dinâmica da luz (DLS- Dynamic Light Scattering, ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville) (Figura 19).



Figura 19: Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instrument (à esquerda) e ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville, NY(à direita).

2.2.3.1.1 Dispersão dinâmica da luz

A DLS é uma técnica analítica usada para a medição de partículas numa gama de tamanho de poucos nm a 3 μm , sendo indicada para a medição de NPs. Um feixe de luz (normalmente *laser*) incide na amostra, e a intensidade da luz dispersa, num determinado ângulo, é medida em função do tempo (Figura 20). A taxa de conversão da intensidade da luz dispersa depende dos movimentos brownianos [154, 155]. Todas as partículas numa dispersão apresentam esse tipo de movimentos, que se caracterizam pelo movimento aleatório dessas partículas, causado pelos choques das moléculas do solvente com as partículas dispersas. Partículas menores têm uma maior taxa de difusão no solvente, movem-se mais rapidamente e tem uma maior variação de intensidade da luz dispersa. Em suma, a DLS determina o diâmetro médio das partículas, pelas flutuações da intensidade da luz dispersa em função do tempo. A análise da DLS estima também um outro parâmetro, índice de polidispersão (IP), que descreve a amplitude da distribuição do tamanho da partícula. O IP varia entre 0 e 1, sendo considerado que os valores de IP abaixo de 0,25 demonstram que a amostra é monodispersa [145, 156-158].

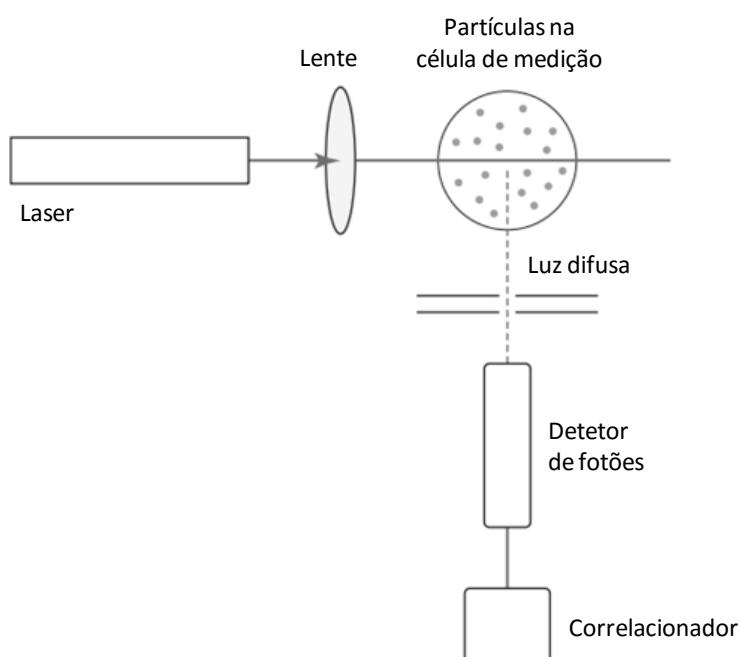


Figura 20: Diagrama esquemático do mecanismo da determinação do tamanho de partícula por DLS [155].

Cada amostra de NPs foi diluída numa proporção de 1:1000 com água ultra pura e colocada numa cuvete para medição. Por cada amostra, o diâmetro médio (z-average) e o IP foram medidos 5 vezes, sendo os dados recolhidos pelo programa informático

Brookhaven Instruments – Zeta Pals Particle Sizing e expressos em média \pm desvio padrão.

2.2.3.1.2 Difração laser

A difração laser é baseada na incidência de luz monocromática, proveniente de um *laser*, nas partículas que compõe a amostra ocorrendo a difração (Figura 21). Esta técnica mede o tamanho de partículas numa gama superior (0,01 a 3500 μm) à da técnica anterior, o que se torna vantajoso pois permite detetar se na amostra existem partículas de maiores dimensões. Mede as distribuições de tamanho das partículas por medição da variação angular na intensidade da luz difundida, à medida que um feixe de laser interage com as partículas dispersas da amostra. Assim, partículas grandes dispersam a luz em pequenos ângulos em relação ao feixe de laser e partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. Os sinais do fluxo de luz recebidos pelo fotodetetor são convertidos em corrente elétrica, que é digitalizada e processada em dados de distribuição de tamanho, com base na teoria da difusão da luz de Mie. O tamanho das partículas é indicado como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente [155].

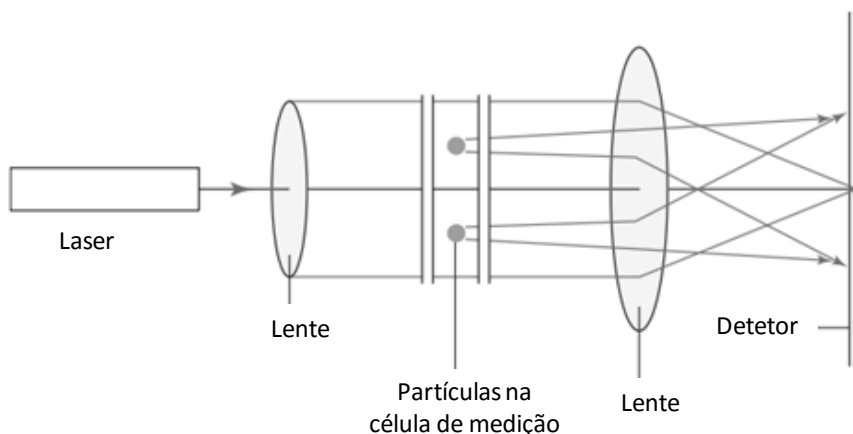


Figura 21: Diagrama esquemático do mecanismo da determinação do tamanho de partícula por LD [155].

As condições utilizadas para a determinação do tamanho de partícula, por difração laser encontram-se na Tabela 6 e foram definidas no início da experiência. A amostra foi sendo adicionada a um gobelé contendo água até atingir um intervalo de obscuração, que variava de 5 a 10%. Por cada amostra, o aparelho fez 5 leituras do tamanho das partículas e apresentou a média e o desvio padrão. O resultado traduz-se num gráfico de densidade em volume (%) em função do tamanho das NPs, e em três

valores, Dv10, Dv50 e Dv 90 (percentil 10, percentil 50 e percentil 90). Estes valores dão a informação de que 10%, 50% e 90%, respetivamente, das partículas apresentam um tamanho abaixo desse valor.

Tabela 6: Condições do método da difração laser.

Partícula	Lípido
Índice de Refração da partícula	1,1
Índice de Absorção da partícula	0,01
Dispersante	Água
Índice de Refração do dispersante	1,33
Modelo	Modelo de Mie

2.2.3.2 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) é uma propriedade física, presente em qualquer partícula em dispersão e reflete o potencial elétrico da superfície das partículas, o qual é influenciado pelas alterações na interface com o meio dispersante. Estas alterações podem consistir na dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou na adsorção de espécies iónicas presentes no meio aquoso de dispersão [159, 160].

O PZ dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Quando as partículas em suspensão têm um PZ elevado (negativo ou positivo), há a tendência para prevalecerem forças de repulsão, ou seja, as partículas tendem a repelirem-se. Assim, a tendência para as partículas se aglomerarem é reduzida e a estabilidade da dispersão é elevada. Geralmente considera-se como limites os valores -30 mV e +30 mV, isto é, uma dispersão em que as partículas apresentem um potencial zeta superior a +30 mV e inferior a -30 mV é considerada estável (em valor absoluto > 30) [160, 161].

A amostra foi colocada numa cuvete, onde é inserido um eletrodo e a medição foi feita 6 vezes, pelo mesmo aparelho da DLS, mas com um programa informático diferente, BIC PALS Zeta Potencial Analyzer. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão.

2.2.3.3 Morfologia das nanopartículas

A morfologia das NPs foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento criogénica (Cryo SEM – Cryogenic Scanning Electron Microscopy).

A SEM é uma técnica que permite a observação e caracterização de amostras no estado sólido, devido à sua elevada resolução (escala nanométrica a micrométrica) [162].

Basicamente, esta técnica consiste na incidência de um feixe de eletrões finamente focado na área a analisar. À medida que este feixe atinge a amostra, os eletrões e fótons, presentes nos elementos da superfície da amostra, são emitidos. A intensidade com que os fótons e eletrões são emitidos é utilizada para formar a imagem, ou seja, a imagem é dependente da interação entre o feixe de eletrões e a amostra [162, 163].

A Cryo SEM é uma extensão da SEM devido à impossibilidade desta última determinar a microestrutura de amostras líquidas. Assim, uma amostra sujeita a Cryo SEM necessita de uma preparação inicial. Antes de submeter à análise de SEM, a amostra é congelada e este processo de arrefecimento deve ser rápido para reduzir a distorção morfológica da amostra. A montagem e a transferência da amostra, após fixação térmica, devem ser feitas sob vácuo, uma vez que o contacto com a atmosfera pode resultar em humidade na amostra [164, 165].

A análise foi realizada utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500), no Laboratório de Microscopia Eletrónica de Varrimento e Microanálise por Raios X do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

As amostras foram previamente diluídas, numa proporção de 1:50 (SLN) ou de 1:25 (NLC). Foram rapidamente arrefecidas (mergulhada em azoto líquido) e transferidas, em vácuo, para a câmara de preparação de amostra com a platina arrefecida. Posteriormente, foram fraturadas, sublimadas durante 120 s a -90°C, e revestidas com Au/Pd, por pulverização iónica, durante 35 s e com uma corrente elétrica de 12 mA. As amostras foram depois transferidas para a câmara do SEM e a observação foi feita a uma temperatura de -150°C.

2.2.4 Eficácia de incorporação do paclitaxel

A separação da fração de substância ativa livre da incorporada nas NPs é uma etapa fulcral para a determinação da eficácia de incorporação. A ultracentrifugação é uma técnica bastante recorrente para a separação das frações [166]. Após a centrifugação, a concentração de substância ativa livre é avaliada no sobrenadante. A concentração total é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em suspensão, num solvente adequado. A concentração de substância ativa incorporada é calculada pela diferença das anteriores [81]. Este método de determinação da quantidade de fármaco incorporada é indireto uma vez que não se determina diretamente a concentração de fármaco que se encontra incorporado, mas sim a diferença entre a concentração total e a do fármaco livre. A principal desvantagem deste método reside no

facto de não considerar a hipótese do fármaco ter precipitado (formação de cristais), ou seja, não se encontrar nem nas NPs nem na dispersão. O método direto constitui uma alternativa ao indireto, uma vez que ultrapassa a principal desvantagem deste. A dispersão das NPs obtida é diluída e filtrada a fim do fármaco não incorporado ser removido e restar apenas as NPs. De seguida, promove-se a libertação do fármaco das NPs por adição de metanol [167]. O método direto foi o método escolhido para determinar a eficácia de incorporação.

As dispersões de NPs (SLN com PTX e NLC com PTX, ambas em triplicado) recém-produzidas são diluídas em água ultra pura numa proporção de 1:5. As amostras diluídas são filtradas, por um filtro de membrana de nitrocelulose de 5 µm (Minisart®) para rejeitar o PTX não incorporado. De seguida procede-se à diluição com metanol numa proporção de 1:20 e posterior agitação manual, para que haja a libertação do PTX que se encontrava incorporado nas NPs. A mistura obtida é centrifugada (5000 rpm durante 15 min) (Thermo SCIENTIFIC HERAEUS) e o sobrenadante é filtrado (filtro PTFE de 0,45 µm, OlimPeak®) para obtermos uma solução de PTX (corresponde ao fármaco que estava incorporado nas NPs). As amostras obtidas são diluídas com uma solução de metanol/água (80/20) numa proporção de 1:3 e avaliadas por HPLC, em que cada amostra foi injetada três vezes. A análise por HPLC das amostras foi feita nas mesmas condições do doseamento do PTX. Por extrapolação da reta obtida na curva de calibração, obtém-se a concentração de PTX real. A concentração teórica do PTX é calculada tendo em conta a quantidade de PTX colocado aquando da produção das NPs e as diluições efetuadas ao longo do procedimento para a determinação da eficácia de incorporação. Sendo assim, a eficácia de incorporação (EI) é calculada através da seguinte fórmula (adaptado de [168]):

$$EI(\%) = \frac{\text{conc.de fármaco no filtrado } [\mu\text{g} / \text{ml}]}{\text{conc.de fármaco contida na formulação } [\mu\text{g} / \text{ml}]} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

2.2.5 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC - Differential Scanning Calorimetry) é uma técnica de análise térmica usada para medir a energia calorífica absorvida/libertada durante o aquecimento/arrefecimento de uma substância ou uma mistura, em relação a uma amostra de referência. A medição dessa energia fornece dados qualitativos e quantitativos nos processos endotérmicos (absorção de energia calorífica) e exotérmicos (libertação de energia calorífica), permitindo inferir se existiram ou não alterações das

propriedades físicas e/ou químicas. A fusão é típica de um processo endotérmico e a cristalização é identificada como um processo exotérmico [169-175].

O aparelho utilizado neste trabalho foi o DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH (Figura 22), constituído por um duplo forno com duas posições, uma para o cadinho da amostra a analisar e outra para o cadinho de referência, que normalmente se encontra vazio. O resultado da análise traduz-se num termograma, sendo a determinação dos parâmetros (entalpia e temperatura de início de fusão) feita com o programa informático NETZSCH Proteus Thermal Analysis. A entalpia corresponde à área do pico, obtida por integração deste. O índice de recristalização (IR) é um parâmetro frequentemente avaliado para comparar a cristalinidade entre as formulações e é calculado com base na ΔH da formulação.



Figura 22: Aparelho de DSC 200 F3 Maia®, NETZSCH.

As formulações foram colocadas na estufa a 37° C durante \pm 24h, para eliminação da água. As amostras (matérias-primas e formulações) foram pesadas num cadinho de alumínio, que foi posteriormente fechado e colocado no forno. As amostras foram submetidas a um programa de temperatura entre -40°C a 270°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. O IR foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$IR (\%) = \frac{\text{entalpia da formulação (SLN ou NLC)} [J / g]}{\text{entalpia do excipiente isolado } [J / g] \times \text{concentração da fase lipídica } [\%]} \quad \text{Equação 3:}$$

2.2.6 Estabilidade

A avaliação da estabilidade de uma formulação é algo de extremamente essencial. É importante que ao longo do tempo, a formulação não apresente, por exemplo, fenómenos de agregação de partículas. O tamanho das partículas (por ambas as

técnicas) e o potencial zeta foram avaliados no tempo 0, 30, 60 e 90 dias. A eficácia de incorporação foi avaliada no tempo 0 e 30 dias e o polimorfismo dos lípidos presentes nas NPs foram avaliados por DSC ao tempo 0, 15 dias e 60 dias. O tempo 0 corresponde ao dia da preparação das NPs.

2.2.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo ao teste paramétrico, t-student ou ANOVA quando se tratava de duas amostras ou mais, respetivamente, após a confirmação de normalidade e homogeneidade da variância com os testes de Shapiro-Wilk e Levene. Diferenças entre mais de dois grupos foram comparadas utilizando um teste post hoc (Tukey HSD). As amostras foram analisadas usando um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa informático SPSS (v 21.0; IBM, Armonk).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Doseamento do Paclitaxel

O doseamento do PTX foi feito recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para o doseamento de uma substância por HPLC, é necessário definir determinadas condições, como os eluentes, a sua percentagem, o volume de injeção, o comprimento de onda de deteção, o fluxo da fase móvel, o tipo de coluna, etc. Numa primeira abordagem, algumas das condições foram adotadas apenas em função do que está escrito na literatura, outras foram exploradas a fim de otimizar o método descrito. O tipo de coluna (C18), o fluxo e os eluentes da fase móvel foram escolhidos com base na literatura [140]. A percentagem dos eluentes, o volume de injeção e o comprimento de onda de deteção foram estudados com vista a alcançar as melhores condições para o doseamento do PTX.

O volume de injeção é uma das condições a definir num método de doseamento por HPLC. Foram testados 4 volumes diferentes e os resultados encontram-se registados na Tabela 7. Como referido no capítulo 2, o volume de injeção adotado foi 30 µL. A decisão foi tomada com base no coeficiente de variação reduzido que este volume de injeção apresenta em praticamente todos os parâmetros (tempo de retenção, área, altura e pratos teóricos), ao contrário dos outros volumes de injeção.

Tabela 7: Registo da média e coeficiente de variação (c.v.) dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria) para diferentes volumes de injeção (10, 20, 30 e 40 μL). Fase móvel 80/20% (v/v) (metanol/água).

		Volume de injeção (μL)			
		10	20	30	40
t_r	Média	2,61	2,61	2,61	2,61
	c.v.	0,19%	0,07%	0,09%	0%
Área	Média	3,59	7,77	11,75	15,87
	c.v.	4,97%	2,87%	0,86%	1,09%
Altura	Média	27,98	47,06	55,45	58,14
	c.v.	4,06%	1,25%	0,75%	0,33%
Pratos Teóricos	Média	2767,67	1579,33	898,33	512
	c.v.	2,76%	4,43%	0,46%	1,89%
Simetria	Média	1,26	1,26	1,13	0,95
	c.v.	1,21%	0,92%	1,85%	3,20%
k'	Média	1,18	1,18	1,17	1,18
	c.v.	0,49%	0%	0,49%	0%

Uma outra condição estudada foi a percentagem de metanol na fase móvel. Foram testadas 3 percentagens, 75%, 80% e 85% e o critério para a escolha da percentagem foi o valor de k' . O valor de k' deve ser, pelo menos, superior a 1. Assim, a percentagem 85% não é aceitável uma vez que o valor de k' é inferior a 1. A escolha pela percentagem de metanol de 80% prendeu-se no facto de diminuir os tempos de corrida e consequentemente o gasto de eluentes (Figura 23).

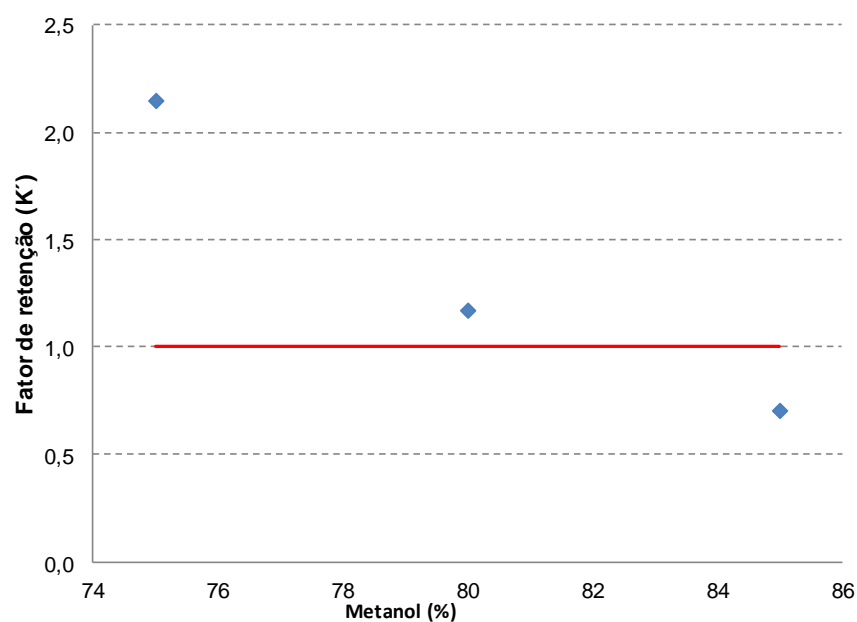


Figura 23: Representação gráfica do fator de retenção em função da percentagem de metanol da fase móvel.

Para além de estar documentado na literatura o comprimento de onda de deteção, foi feito um espectro de absorção de uma solução de PTX (em metanol/água, 80:20) a fim de confirmar com o da literatura. A amostra (solução de PTX) foi analisada por espectrofotometria no intervalo de comprimento de onda de 200 a 400 nm. O espectro obtido (Figura 24) mostra que há um pico por volta dos 230 nm o que está de acordo com a literatura [140], portanto foi o utilizado para a deteção no doseamento do PTX.

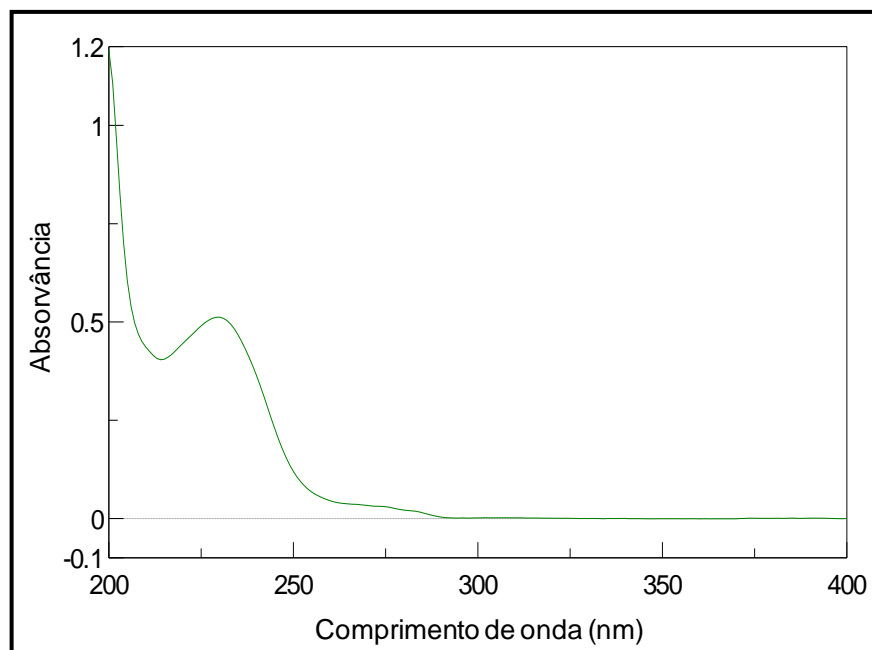


Figura 24: Espectro de absorção do paclitaxel.

Após as condições cromatográficas estarem definidas, foi obtido o cromatograma (Figura 25), sendo o passo seguinte avaliar alguns parâmetros da validação do método de doseamento do PTX pela HPLC.

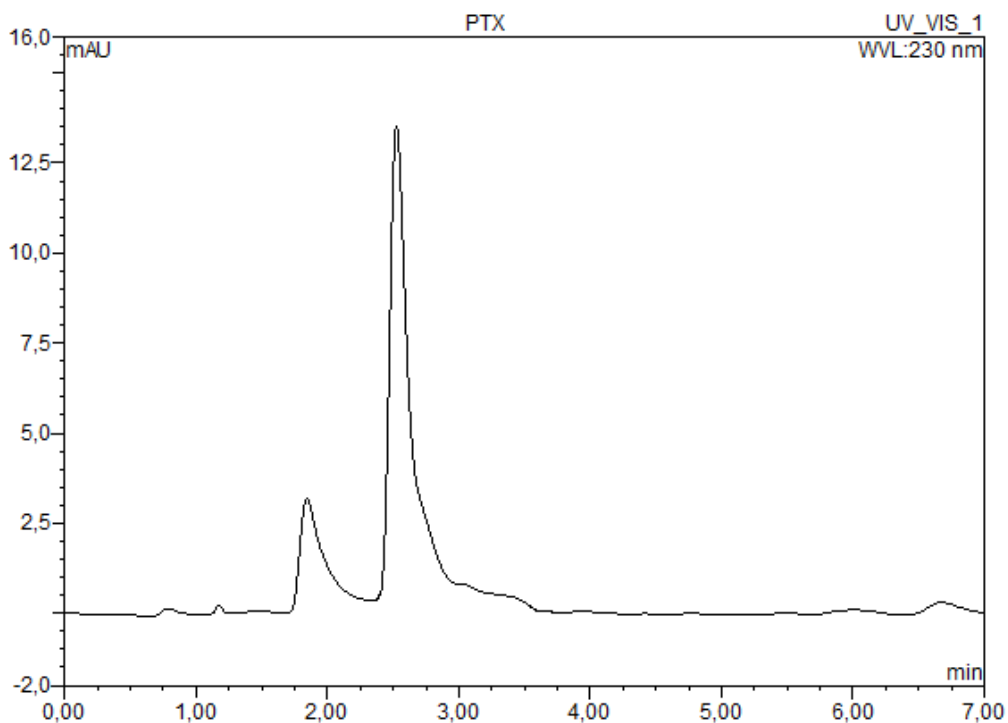


Figura 25: Cromatograma do Paclitaxel.

A validação de um método analítico, requer o estudo de vários parâmetros, como a exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade),

especificidade, linearidade, a amplitude, etc., dependendo do objetivo do método [176]. Neste estudo para o doseamento do PTX não foi possível avaliar todos os parâmetros devidos, pelo que o método de doseamento do PTX não foi totalmente validado. Assim foi avaliada a especificidade, a precisão e a linearidade do método e indicada uma gama de trabalho.

A seletividade é definida como a capacidade de determinar um analito na presença de outras substâncias suscetíveis de estarem presentes na amostra, como impurezas, etc. Para avaliar este parâmetro, foi analisado o pico do PTX, em 3 pontos, no cromatograma. Ao analisar estes 3 pontos, verifica-se que os 3 espectros são praticamente sobrepostos (Figura 26), o que indica que este pico é realmente apenas de uma substância, não havendo interferência de outras. Para além disso, a sobreposição dos espectros é similar ao espectro obtido por espectrofotometria.

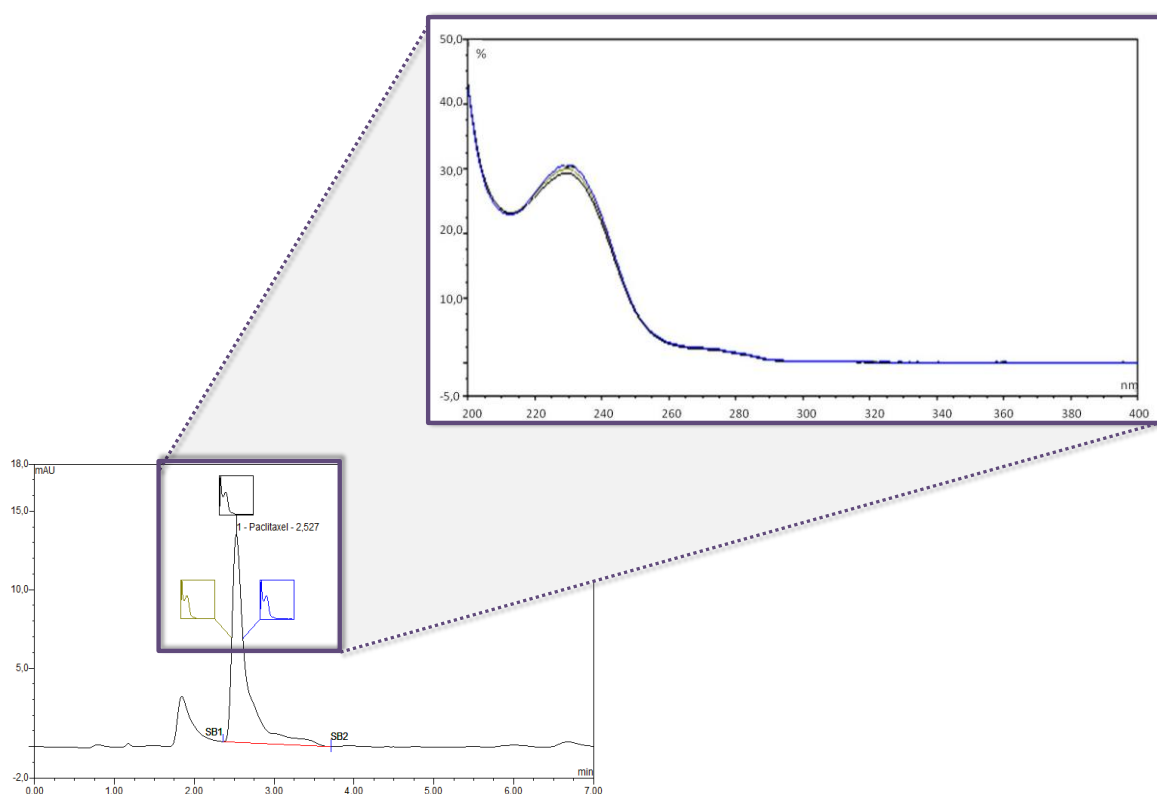


Figura 26: Representação gráfica do cromatograma do PTX evidenciando 3 pontos distintos do seu pico e dos espectros de absorção em cada ponto.

A precisão é a medida de proximidade dos valores, uns em relação aos outros para um certo número de determinações nas mesmas condições analíticas. Pode ser considerada a 3 níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. A repetibilidade (Tabela 8) foi estudada.

Tabela 8: Precisão das áreas dos picos do PTX de 3 ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade).

Conc. PTX (µg/mL)	Área (mAU*min)			Média ± C.V.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2,7	2,060	2,054	2,061	2,061 ± 0,3%
3,3	2,554	2,535	2,549	2,553 ± 0,7%
3,6	2,785	2,777	2,782	2,781 ± 0,1%

A precisão foi avaliada para 3 concentrações de PTX, 1,8; 2,7; e 3,3 µg/mL e os resultados expressos em média ± coeficiente de variação. O critério para averiguar a precisão é o valor do coeficiente de variação. O método do doseamento do PTX apresenta repetibilidade, uma vez que o coeficiente de variação é baixo (inferior a 1%).

A linearidade é um parâmetro bastante útil, uma vez que garante proporcionalidade entre o parâmetro analisado (exemplo: área) e a concentração da amostra. A curva de calibração permite determinar a concentração do analito presente na amostra, por interpolação de resultados obtidos com padrões de concentrações conhecidas. A curva de calibração foi obtida através da média de 3 curvas padrão, em que cada uma é formada por 5 pontos, área do pico de PTX em função da concentração (1,8; 2,4; 2,7; 3,3 e 3,6 µg/mL) (Figura 27) por regressão linear simples, utilizando o Método dos Quadrados Mínimos. Foi obtido o coeficiente de determinação (R^2) de 0,9974 e o valor de soma do quadrado dos desvios (SQD) de 0,0044. Estes valores são indicativos da presença de linearidade na amplitude testada, uma vez que refletem a elevada proximidade entre os pontos obtidos experimentalmente e os pontos teóricos obtido a partir da equação da reta, $y = 0,9146 x - 0,2393$. Na Figura 28, está representado o gráfico dos desvios em relação aos pontos teóricos que mostra que estes são reduzidos e dispostos aleatoriamente. O fator resposta (Figura 29), obtido pela razão entre a resposta do detetor do HPLC (área) e a respetiva concentração de cada padrão, está situado entre os ± 10%. Assim, na amplitude testada é possível determinar a concentração de uma solução de PTX, através da equação da reta.

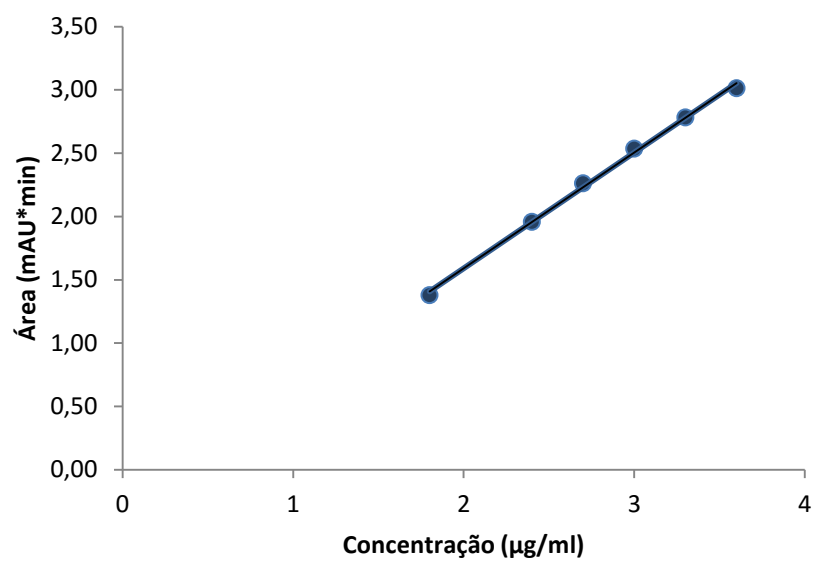


Figura 27: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,9146x - 0,2393$; $R^2 = 0,9974$ e $SQD = 0,0044$. Esta curva de calibração foi obtida a partir da média de 3 curvas independentes.

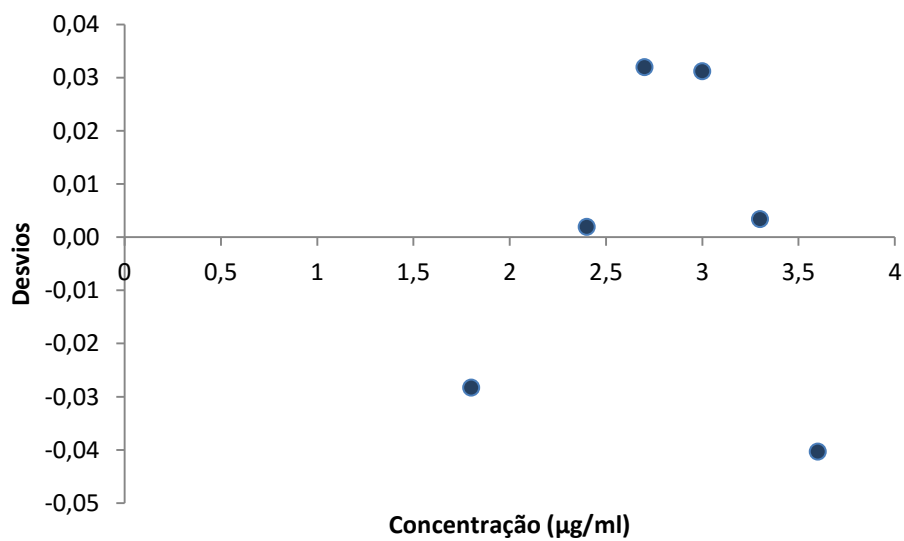


Figura 28: Representação gráfica dos desvios à linearidade.

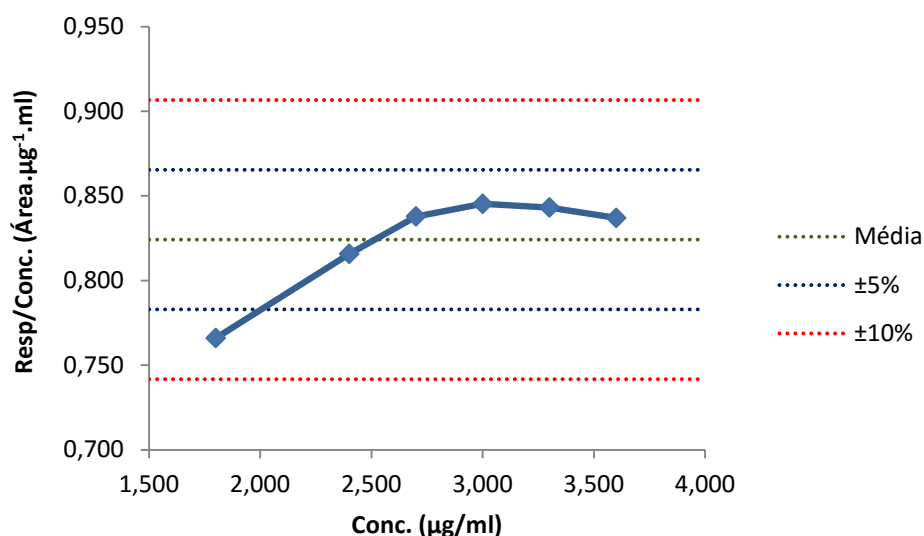


Figura 29: Representação gráfica da resposta do detetor em função da concentração.

3.2. Caracterização das Nanopartículas

3.2.1. Tamanho de partícula

O tamanho das partículas é um dos aspetos mais importantes para a sua utilização na terapêutica. Partículas com um tamanho entre os 100 e 500 nm têm sido reportadas como as NPs com maior potencial para a terapêutica, uma vez que permanecem mais tempo na circulação sanguínea. As partículas com tamanho inferior a 100 nm são rapidamente eliminadas pela excreção renal e as partículas com mais de 500 nm são rapidamente fagocitadas pelas células do sistema fagocitário mononuclear. As NPs para o tratamento do glioma devem possuir um tamanho entre os 100 e os 200 nm, porque se mantêm mais tempo em circulação, logo estão mais tempo em contacto com a BHE. Estando mais tempo em contacto com a BHE, as NPs ser captadas pelas células endoteliais ou libertarem o fármaco e este atingir o cérebro [177].

Numa primeira fase, foram estudadas algumas condições, como a percentagem de lípido, a velocidade de homogeneização e o método de preparação, de forma a atingir uma formulação e um método para dar continuidade ao trabalho (Tabela 9). Apesar deste pequeno desenvolvimento da formulação, a preparação das NPs foi baseada em estudos já publicados [145, 148]. Todas as condições foram avaliadas quer para as SLN quer para as NLC.

Tabela 9: Condições estudadas para a preparação de NPs.

Quantidade de lípido (%)	5
	10
Velocidade de homogeneização (rpm)	8000
	13500
Método de preparação	HAV
	HAP

Em primeiro lugar, foi selecionado o método de preparação e a percentagem de lípido, com base no diâmetro mediano das NPs obtidas. Para isso, todas as NPs preparadas foram submetidas a uma velocidade de homogeneização (ultra turrax) de 13500 rpm. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 30.

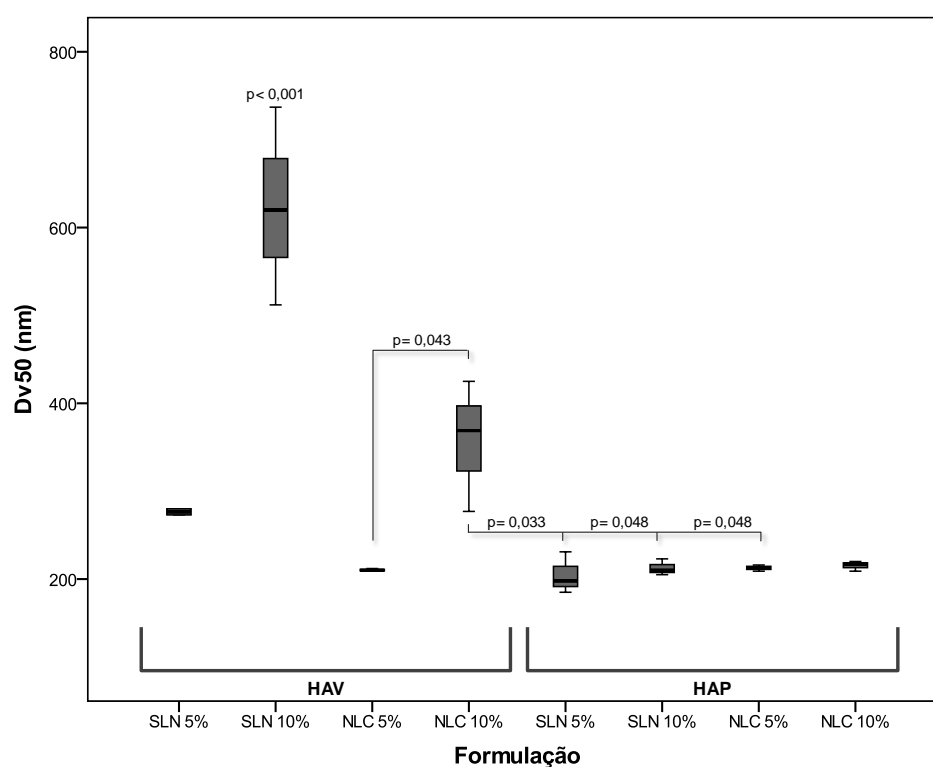


Figura 30: Diâmetro mediano das NPs lipídicas preparadas por dois métodos distintos (HAV – Homogeneização a alta velocidade; HAP- homogeneização a alta pressão), a duas percentagens de lípido e a 13500 rpm de homogeneização.

As NPs preparadas com 10% de lípido no método HAV apresentam tamanhos superiores às obtidas em outras condições. Assim, as NPs lipídicas com 5% de lípido foram as adotadas para prosseguir o estudo. Relativamente ao método de preparação, as

SLN obtidas por HAV apresentavam um diâmetro mediano superior (estatisticamente significativo) às restantes NPs com 5% de lípido (Figura 31). Assim, foi selecionada a HAP como o método de preparação das NPs deste trabalho. Corroborando os resultados obtidos neste trabalho, a HAP está descrita na literatura como um método vantajoso relativamente aos restantes, uma vez que apresenta facilidade de transposição de escala, permite a obtenção de dispersões de NPs relativamente homogêneas. Estas vantagens refletem uma maior estabilidade física da dispersão coloidal, simplicidade de execução e rentabilidade do processo [89, 152]. Não obstante, a HAV apresenta uma maior probabilidade de produzir micropartículas e libertar contaminantes metálicos para a amostra [84].

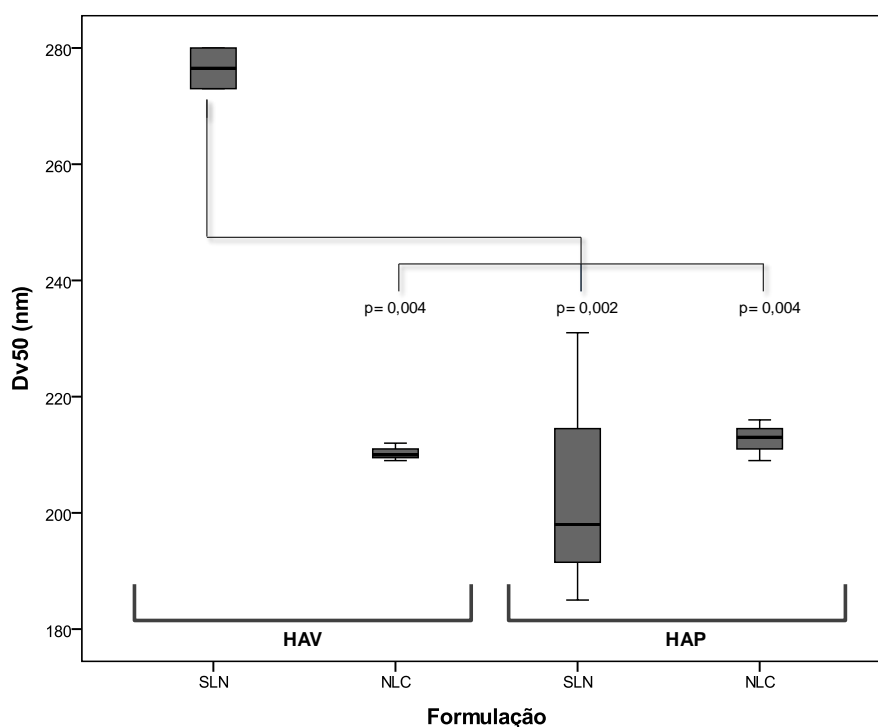


Figura 31: Diâmetro mediano das NPs lipídicas preparadas por dois métodos distintos (HAV – Homogeneização a alta velocidade; HAP- homogeneização a alta pressão), com 5% de lípido e a 13500 rpm de velocidade de homogeneização.

Por último, foi testada a condição da velocidade de homogeneização. Não houve diferenças significativas para o diâmetro mediano das NPs (SLN e NLC) quando estas foram preparadas com uma velocidade de homogeneização de 13500 ou 8000 rpm (Figura 32). Não havendo diferenças em termos de tamanho de NPs, a velocidade adotada foi de 8000 rpm, por ser menor e por consequente não submeter a amostra a uma tensão de corte tão elevada.

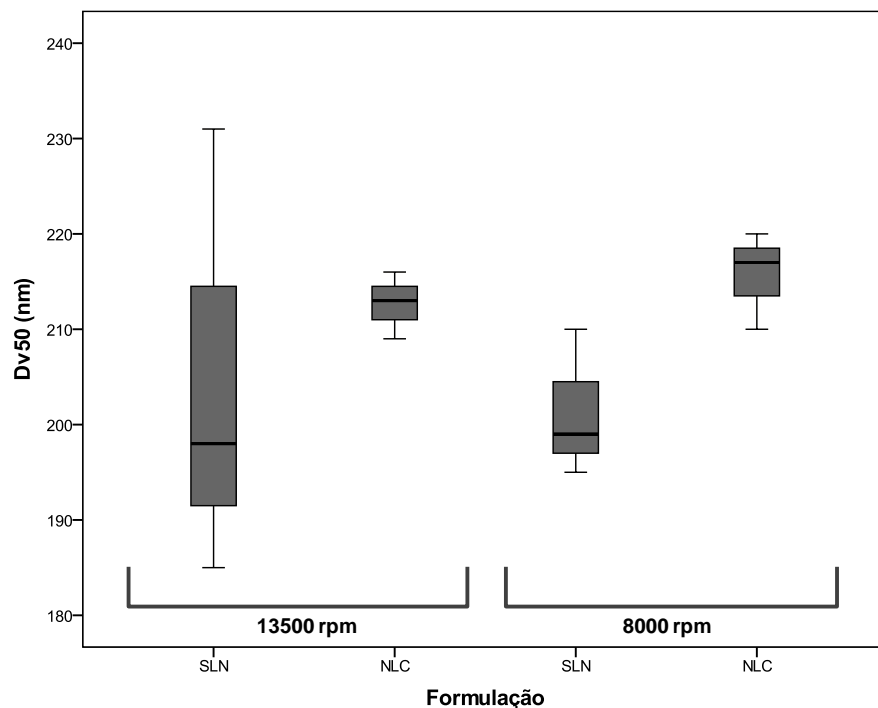


Figura 32: Diâmetro mediano das NPs lipídicas preparadas com duas velocidades de homogeneização diferentes, com 5% de lípido e por HAP (homogeneização a alta pressão).

Após a escolha das condições da preparação e a formulação, foram preparadas SLN e NLC com 0,1% de PTX. O tamanho destas formulações foi avaliado por dois métodos (DLS e LD).

Com a análise por LD, o tamanho mediano das SLN e NLC não aumenta na presença de PTX (Figura 33 e Figura 34). Os resultados foram satisfatórios, uma vez que o tamanho das NPs não é diferente quando encapsulam o fármaco. Contudo, apresentaram um tamanho mediano médio superior a 200 nm, o que poderá ser um problema no caso do direcionamento a tumores [15, 178, 179].

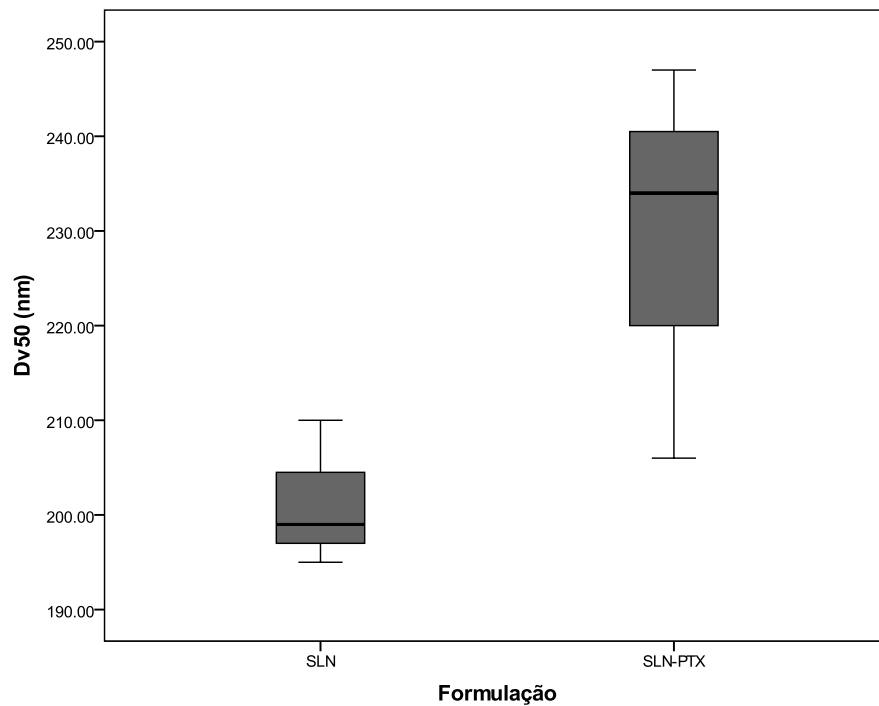


Figura 33: Tamanho mediano das SLN e SLN contendo PTX, determinado pela técnica de LD. $p= 0,099$.

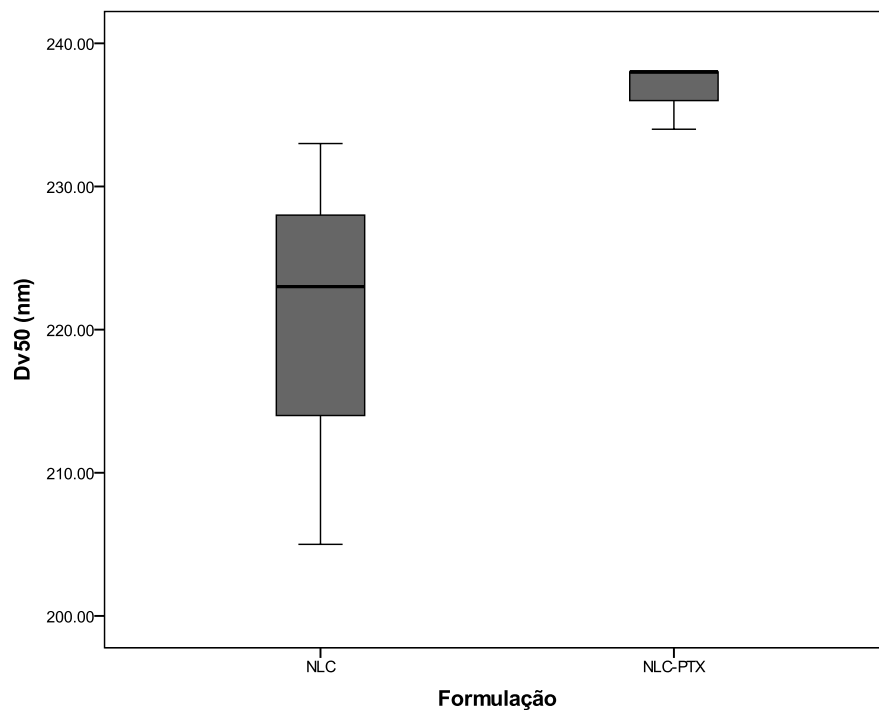


Figura 34: Tamanho mediano das NLC e NLC contendo PTX, determinado pela técnica de LD. $p= 0,120$.

A análise por DLS, permitiu também verificar que a encapsulação do fármaco nas NPs não alterou o seu diâmetro médio (Figura 35 e Figura 36). Esta técnica permite inferir se a amostra é mono ou polidispersa através do valor de IP. As SLN e NLC com e sem PTX, apresentaram um IP inferior a 0,25, SLN ($0,118 \pm 0,062$), SLN-PTX ($0,176 \pm 0,026$), NLC ($0,151 \pm 0,046$), NLC-PTX ($0,145 \pm 0,029$), sendo consideradas monodispersas. Ao contrário das NPs analisadas por LD, as NPs analisadas por DLS apresentaram um diâmetro inferior a 200 nm, o que possibilita o direcionamento a tumores. Contudo, a DLS é uma técnica de análise de tamanho de partícula mais limitada do que a LD, uma vez que não deteta partículas com diâmetro superior a 3 μm , o que pode inviabilizar os resultados.

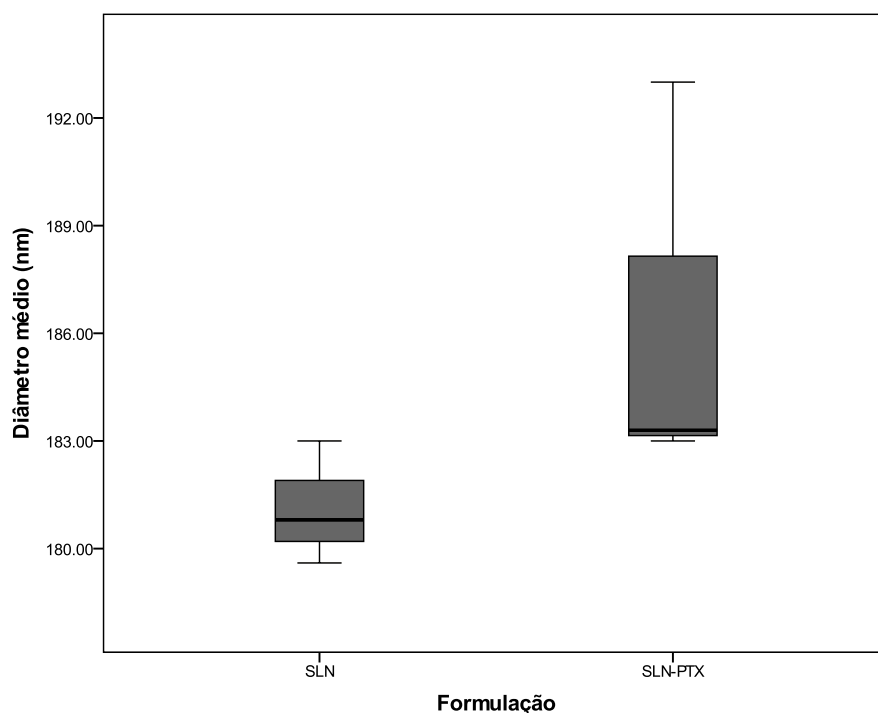


Figura 35: Diâmetro médio das SLN e SLN contendo PTX, determinado pela técnica de DLS. $p=0,197$.

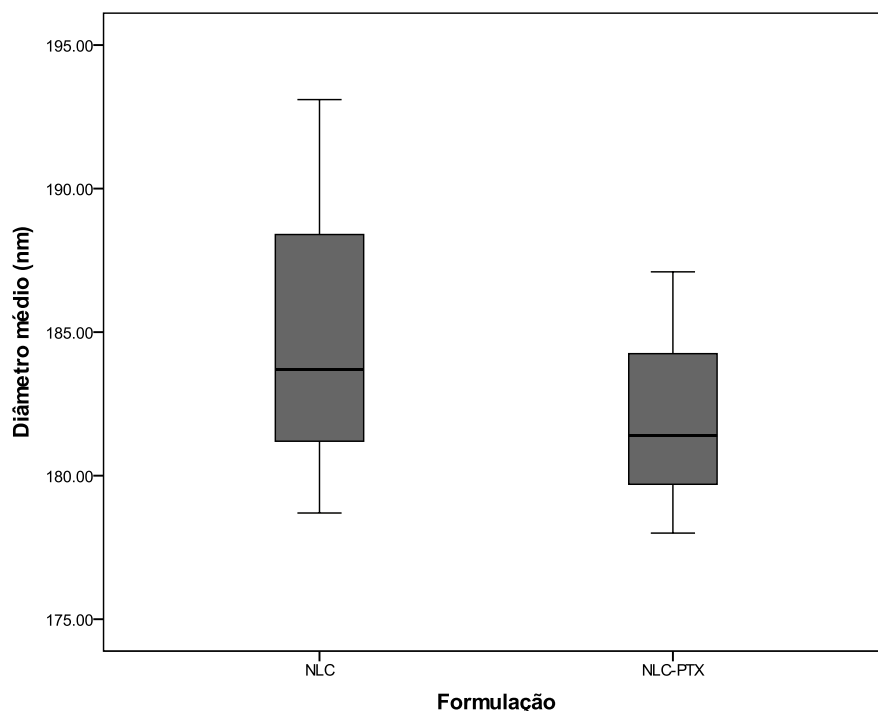


Figura 36: Diâmetro médio das NLC e NLC contendo PTX, determinado pela técnica de DLS. $p = 0,580$.

3.2.2. Potencial zeta

O PZ dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Quando as partículas em suspensão têm um PZ elevado (negativo ou positivo), há a tendência para prevalecerem forças de repulsão, evitando a agregação das partículas [160]. Todas as formulações apresentaram um PZ negativo e elevado, $-40,6 \pm 2,7$ mV (SLN vazias), $-32,0 \pm 5,9$ (SLN-PTX), $-40,5 \pm 2,4$ mV (NLC vazias), $-35,2 \pm 8,4$ mV (NLC-PTX). Estes resultados, por serem negativos e elevados, indicam que estas NPs são indicadas para o tratamento do glioma [180]. Uma outra vantagem das NPs apresentarem carga negativa é serem menos tóxicas e mais estáveis do que as NPs carregadas positivamente [181].

3.2.3. Morfologia das partículas

As NPs caracterizam-se por serem partículas de dimensões nanométricas e esféricas. A morfologia foi avaliada por Crio-SEM, uma vez que a amostra se encontrava no estado líquido. Os resultados obtidos revelam que a morfologia das NPs é idêntica nas 4 formulações. As NPs não apresentaram um aspeto esférico perfeito, contudo o tamanho foi concordante com o determinado nas técnicas LD e DLS (Figura 37).

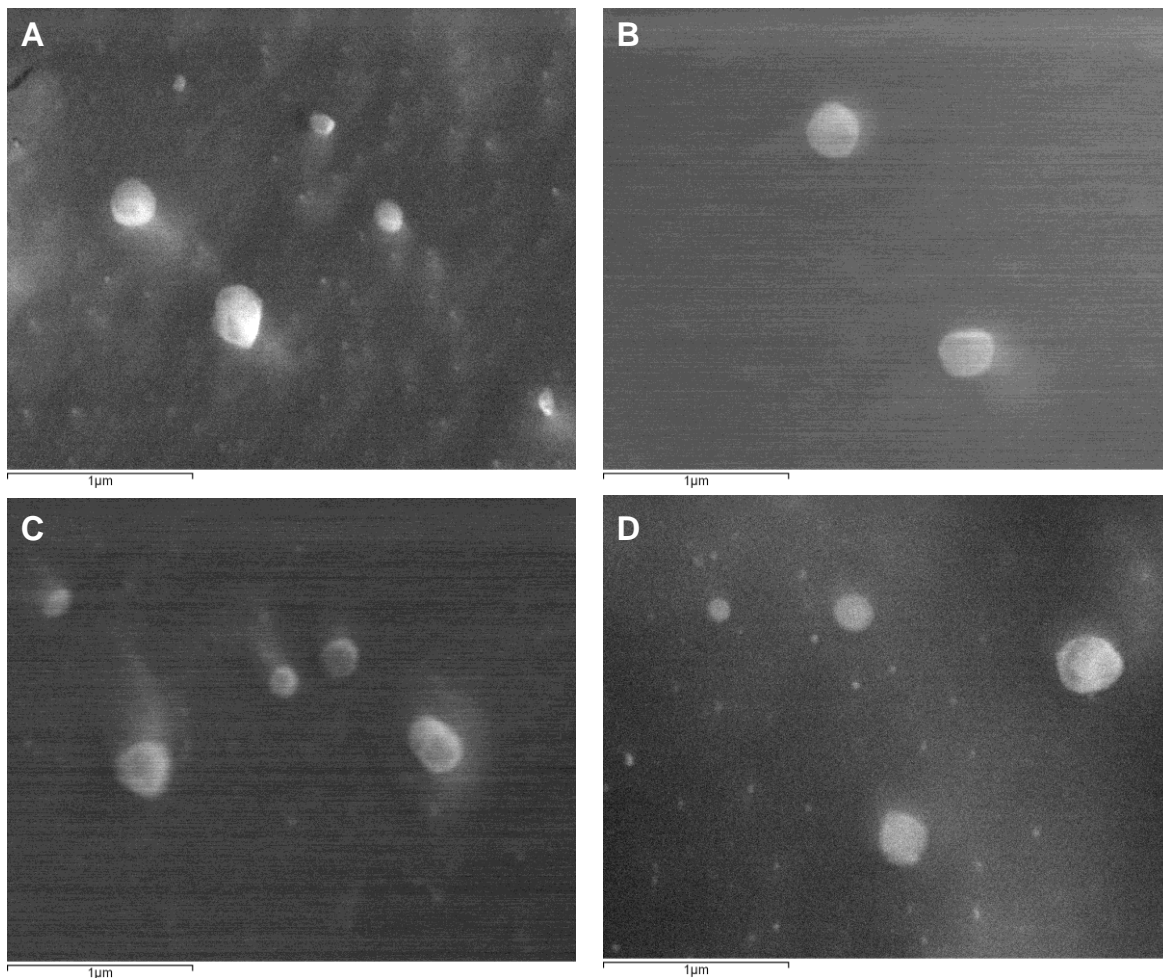


Figura 37: Imagens das NPs obtidas por CrioSEM. A- SLN vazias, B- SLN-PTX, C- NLC vazias e D- NLC- PTX.

3.3. Eficácia de incorporação do paclitaxel

A EI do PTX nas SLN ($51\% \pm 0,078$) e NLC ($55\% \pm 0,13$) não apresentou diferenças estatisticamente significativas como pode ser visto pelo valor de $p = 0,699$ (Figura 38). Estes valores, relativamente baixos, podem ser justificados pela não dissolução total do fármaco na mistura lipídica durante a preparação e pelo método (direto) utilizado para determinar a EI do PTX. O método direto implica mais perdas do que o indireto, contudo o indireto apresenta uma desvantagem, que é o facto de não ter em conta a quantidade de fármaco que poderá precipitar. A otimização do método da determinação da EI e/ou a utilização de lípidos onde o PTX se dissolvesse poderiam aumentar a EI.

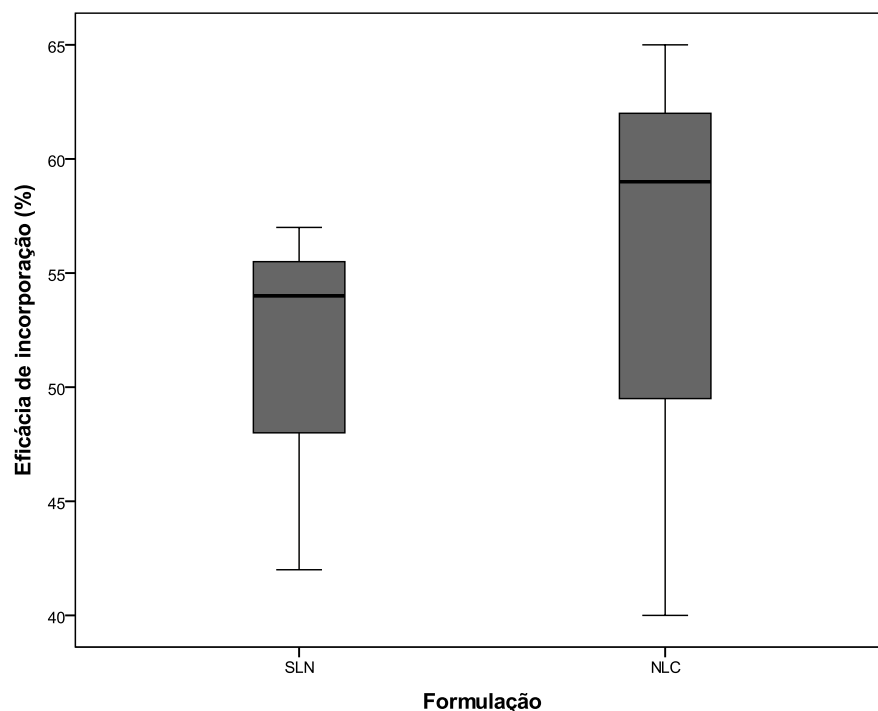


Figura 38: Eficácia de incorporação do PTX nas SLN e NLC. $p=0,699$.

3.4. DSC

O início do ponto de fusão (*Onset*) das SLN (com e sem PTX) é ligeiramente superior ao do palmitato de cetilo, contudo, são diferenças que no máximo correspondem a 1°C (Tabela 12, Figura 39 e Figura 40). Estas diferenças podem ser justificadas tendo em conta a integração manual feita para obter o valor de *onset*. Seria espectável que o *onset* das SLN fosse inferior ao do palmitato de cetilo, devido à presença do polissorbato 80. Relativamente às NLC, o seu *onset* é inferior ao do palmitato de cetilo e os resultados podem ser justificados pela presença do Miglyol 812 e do polissorbato 80 (Tabela 10, Figura 41 e Figura 42) [83]. Também as NLC apresentam um *onset* inferior ao das SLN, sendo a justificação também devido à presença do Miglyol 812. O pico do PTX, referente à fusão, não aparece no termograma das SLN e NLC. Este facto pode ser justificado pela dissolução do PTX nos lípidos ou pela pequena quantidade de PTX analisada na amostra das NPs.

As NLC-PTX apresentaram um IR inferior à das SLN-PTX (Tabela 10), o que vai de encontro com a literatura [182]. Uma estrutura lipídica bastante organizada apresenta uma menor capacidade de incorporação de fármaco [182], ou seja, uma menor EI. Contudo, os resultados da EI nas SLN e NLC não demonstraram diferenças, não reforçando assim os resultados do IR. Contudo, apesar da EI das NLC ter sido superior à das SLN, esta diferença não foi significativa. No entanto, convém ressaltar que o n.º de

amostras utilizado neste estudo foi relativamente baixo (n=3), logo a repetição do ensaio, usando um número superior de amostras independentes e réplicas é desejável.

Tabela 10: Registo dos parâmetros (início do ponto de fusão, entalpia e índice de recristalização) da análise da DSC, das matérias-primas e formulações.

		Onset (°C)	Entalpia (J/g)	IR (%)
Palmitato de Cetilo		49,1	-176,3	-
Miglyol 812		-10,3	-22,58	-
Tween 80		-20,7	-	-
Paclitaxel		138,3	-53,15	-
SLN		50,1	-156,1	88,5
SLN-PTX		49,8	-164,6	93,4
NLC	A	-8,6	-84,3	-
	B	45,5	-161,6	91,7
NLC-PTX	A	-8,8	-100,3	-
	B	44,6	-139,9	79,3

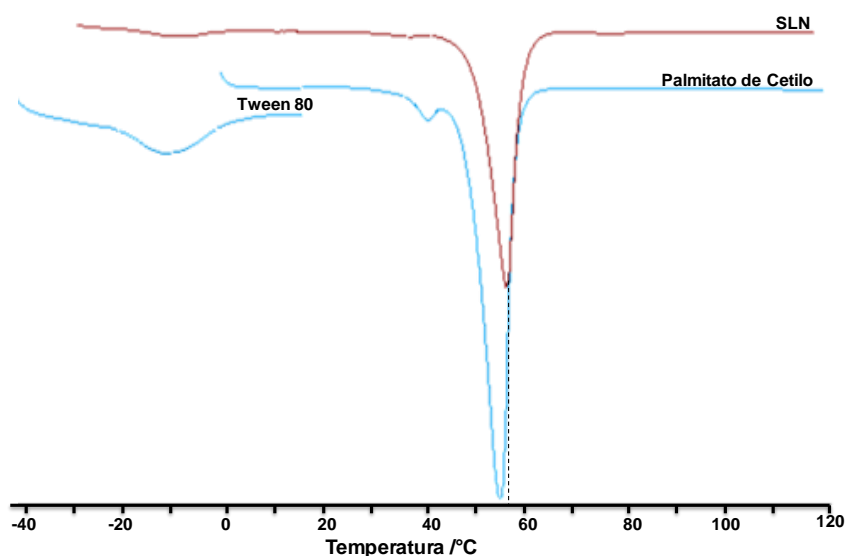


Figura 39: Termograma das SLN e seus constituintes.

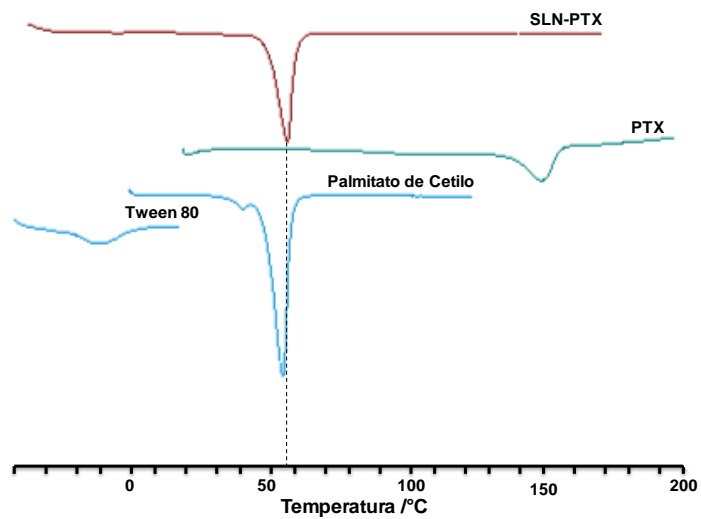


Figura 40: Termograma das SLN-PTX e seus constituintes.

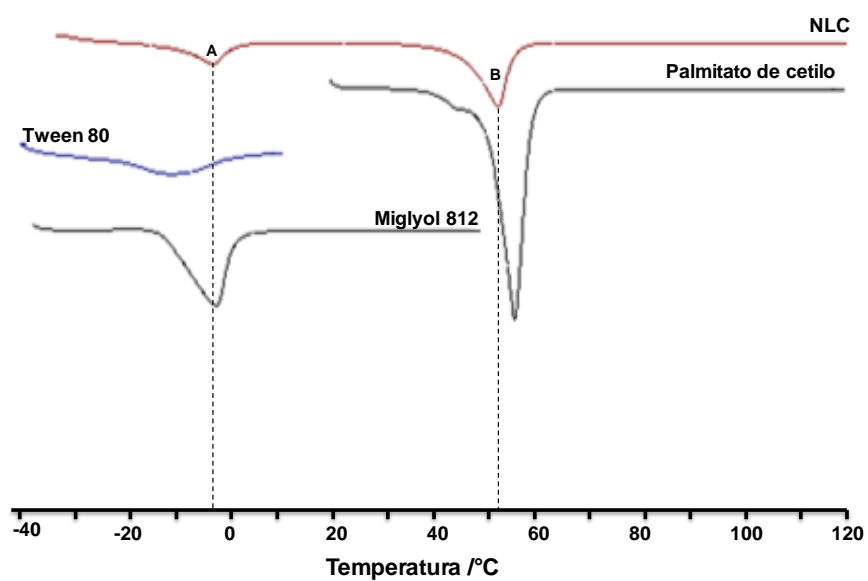


Figura 41: Termograma das NLC e dos seus constituintes.

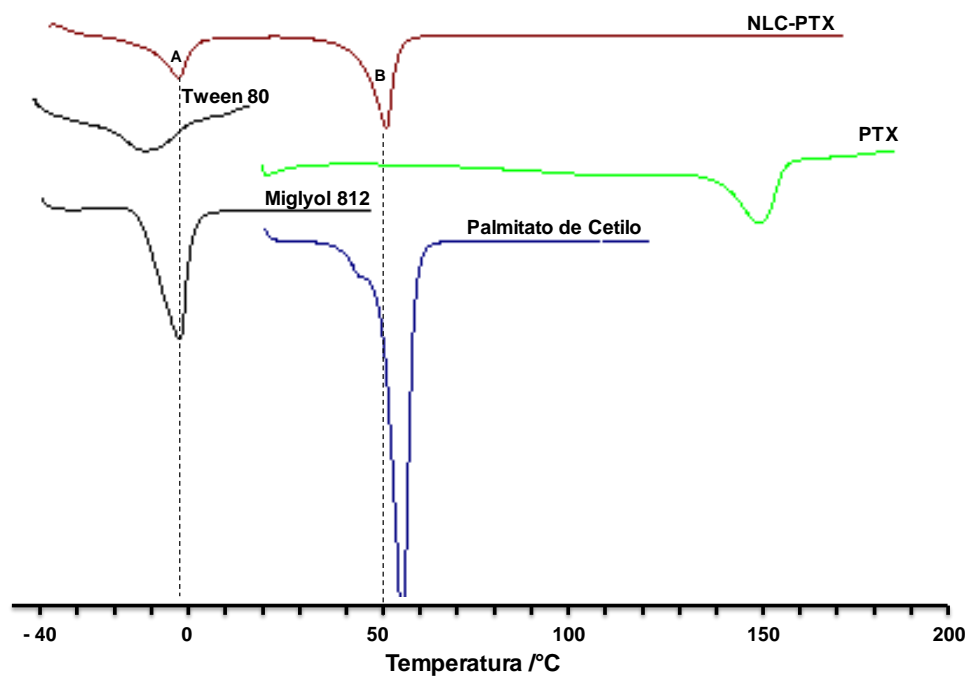


Figura 42: Termograma das NLC- PTX e dos seus constituintes.

3.4. Estabilidade

A estabilidade de uma formulação é assegurada com a inalteração das suas características físico-químicas, como o tamanho, potencial zeta, IR e a EI ao longo do tempo. Estes parâmetros foram estudados ao longo de tempos diferentes para as formulações, SLN e NLC com e sem fármaco. O tamanho (avaliado por LD e DLS) e potencial zeta foi determinado no dia da preparação das NPs (dia 0), após 30, 60 e 90 dias. O IR foi determinado no dia 0, 15 e 60, e a EI foi determinada no dia 0 e 30.

O diâmetro médio, determinado por DLS, das SLN com e sem fármaco não sofreu alterações ao longo do tempo analisado (Figura 43 e Figura 44, respetivamente). Relativamente ao diâmetro médio das NLC, apenas as que não tinham PTX é que ao fim de 90 dias aumentaram de tamanho (Figura 45). O diâmetro médio das NLC com PTX não sofreu alterações ao longo do tempo (Figura 46).

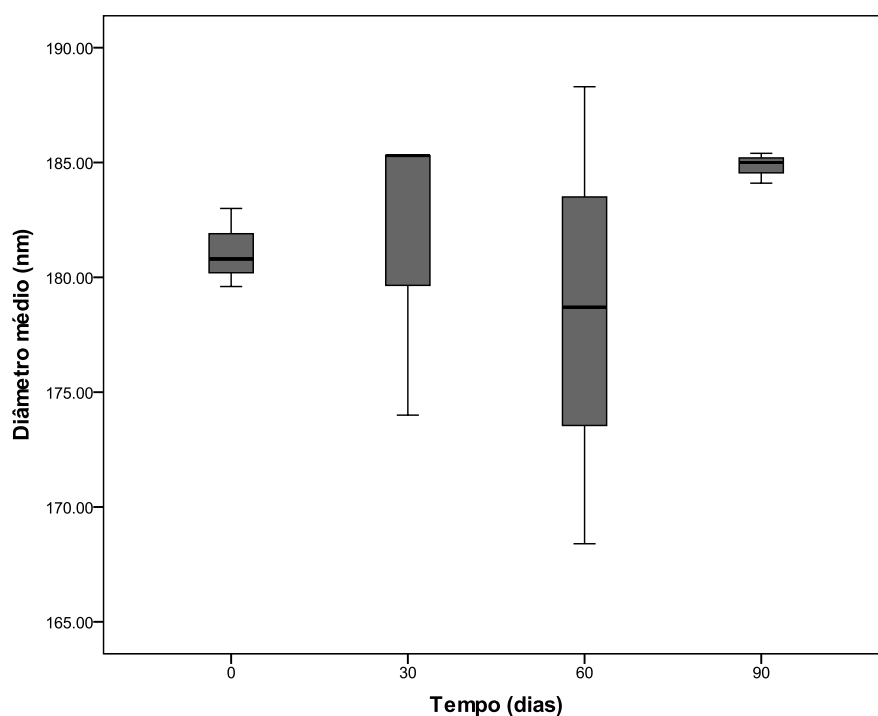


Figura 43: Diâmetro médio das SLN vazias ao longo do tempo, determinado por DLS.
 $p > 0,05$.

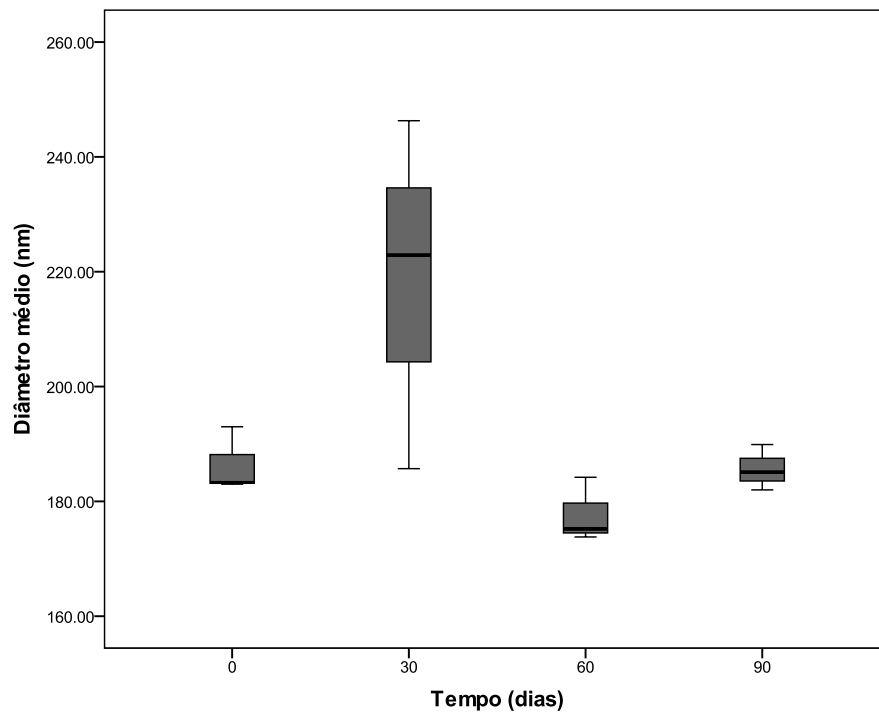


Figura 44: Diâmetro médio das SLN com PTX ao longo do tempo, determinado por DLS.
 $p > 0,05$.

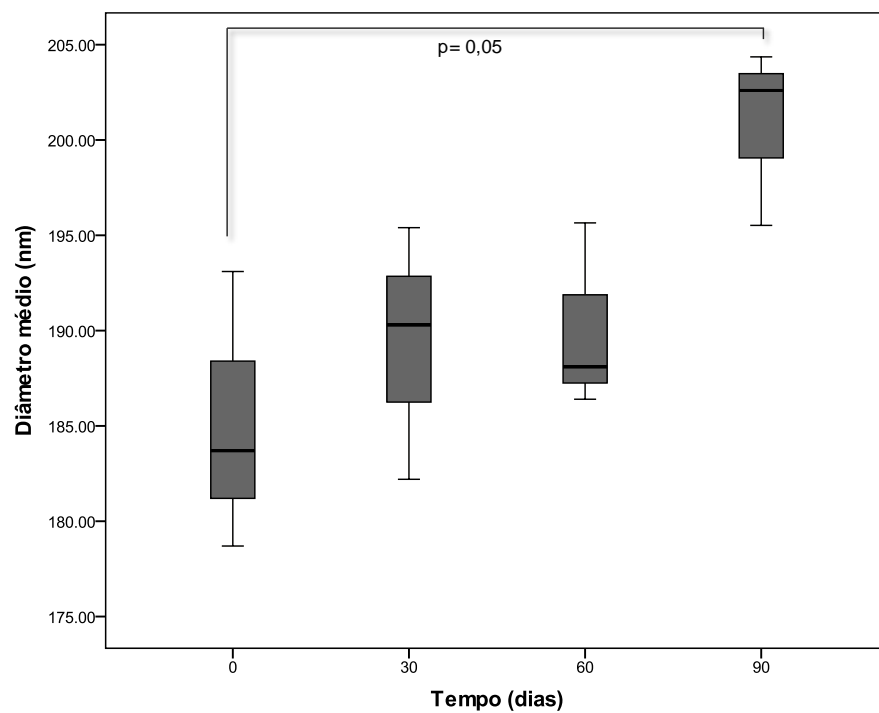


Figura 45: Diâmetro médio das NLC ao longo do tempo, determinado por DLS.

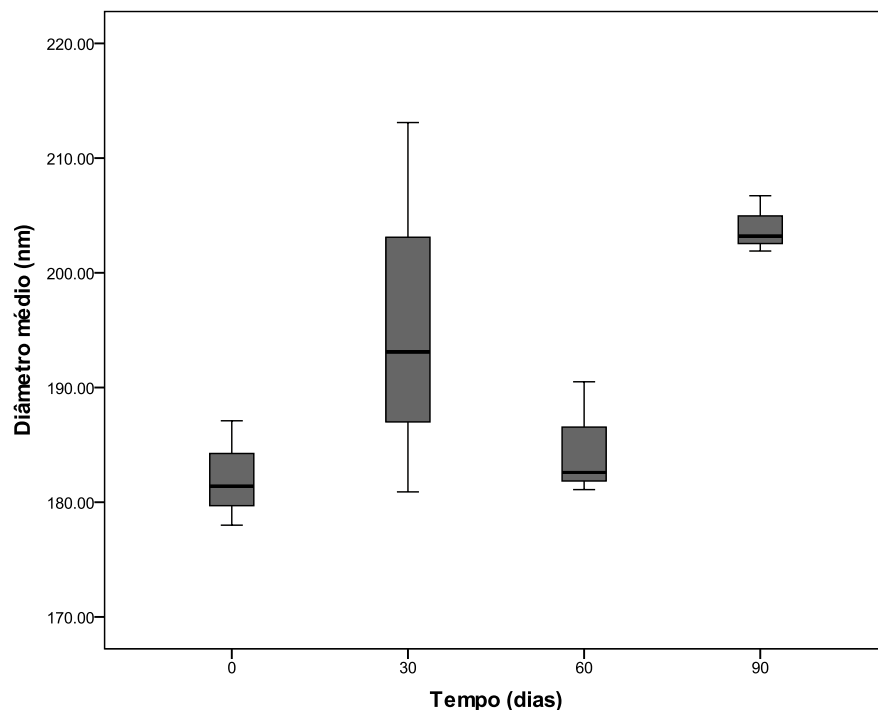


Figura 46: Diâmetro médio das NLC-PTX no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por DLS. $p > 0,05$.

Por análise de LD, as SLN sem PTX, ao fim de 30 dias diminuíram significativamente o seu tamanho, sendo que, ao fim de 60 dias apresentavam o tamanho original, mantendo-o até ao 90º dia (Figura 47). As SLN com PTX, também diminuíram de tamanho ao fim de 30 dias e adquiriram o tamanho inicial ao fim de 60 dias, contudo, após 90 dias apresentavam um tamanho significativamente superior ao que tinham no dia da preparação (Figura 48). Relativamente às NLC sem PTX, o seu diâmetro mediano aumentou significativamente até ao 60º dia, contudo, do 60º dia para o 90º dia, o diâmetro mediano das NLC diminui (Figura 49). As NLC com PTX, mantiveram o seu tamanho até ao 60º dia, apresentando, 90 dias após a preparação, um tamanho superior ao dos outros dias de análise (Figura 50).

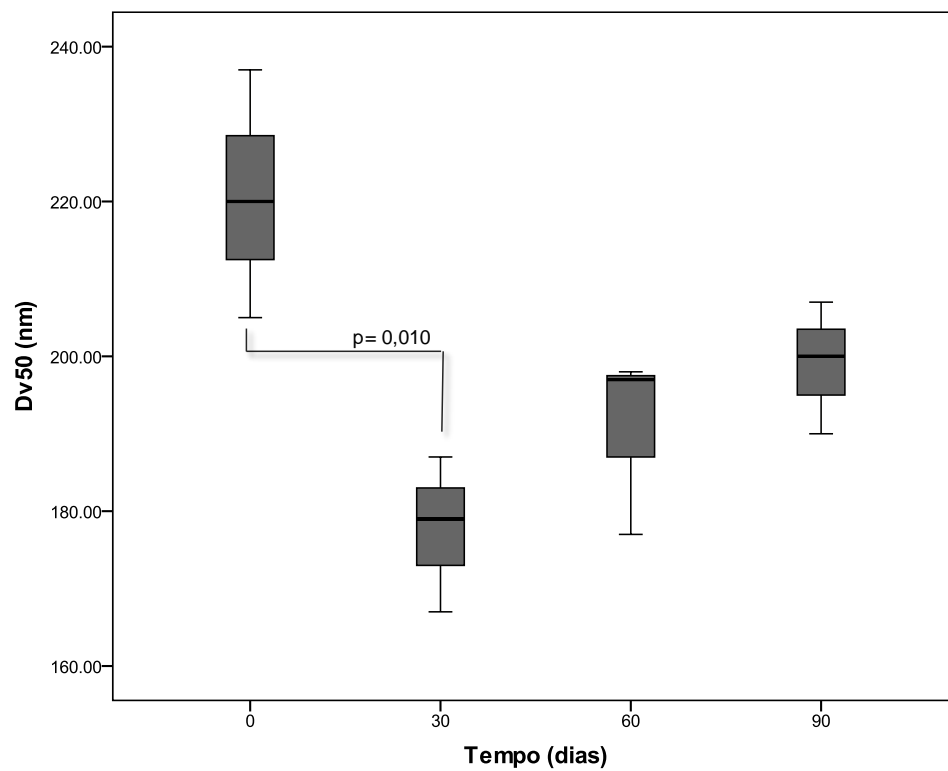


Figura 47: Diâmetro mediano das SLN no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.

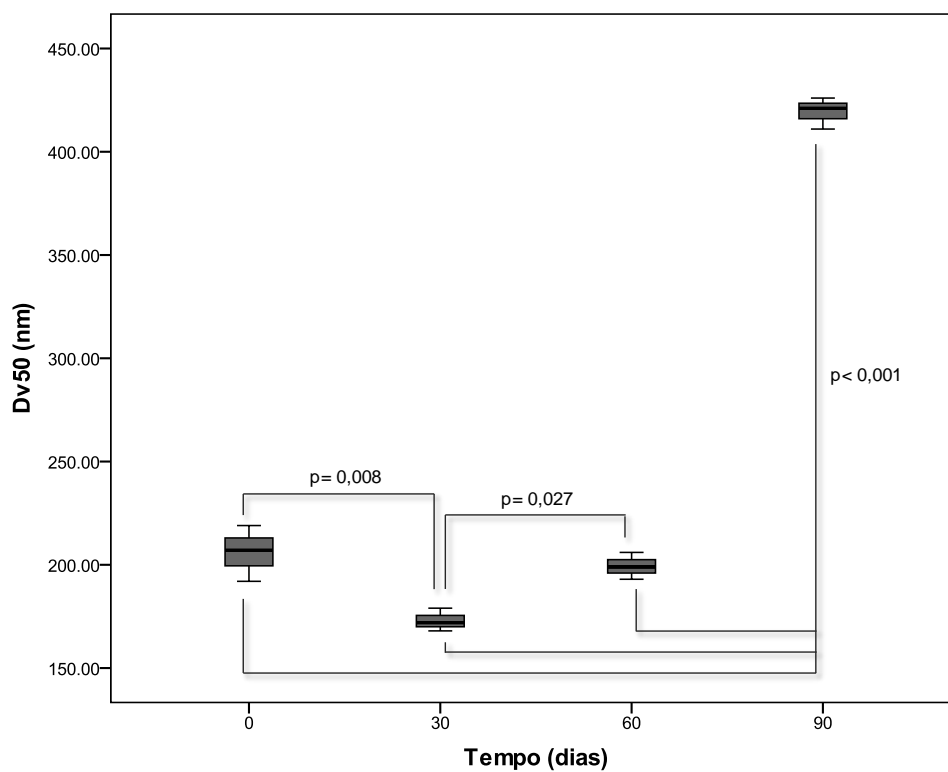


Figura 48: Diâmetro mediano das SLN-PTX no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.

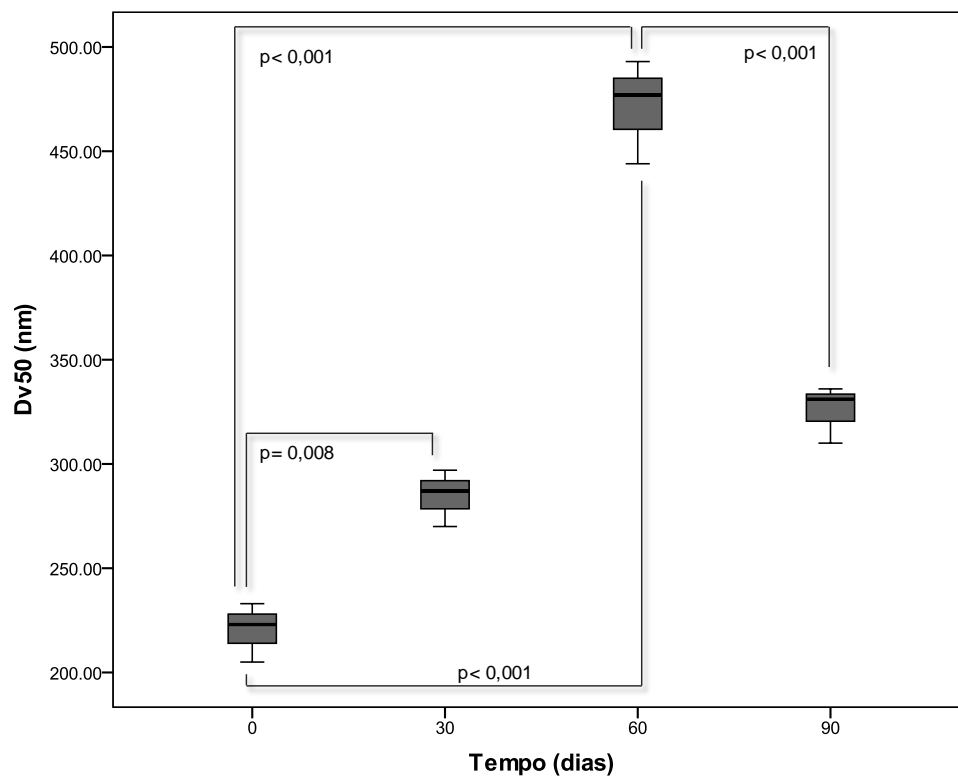


Figura 49: Diâmetro mediano das NLC no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.

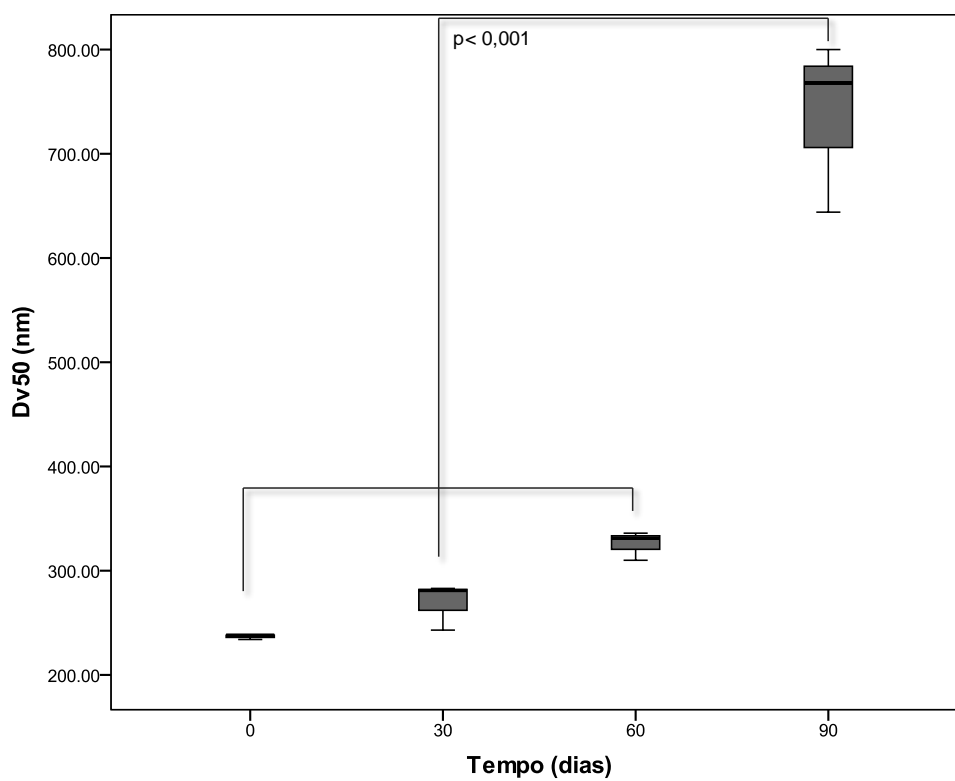


Figura 50: Diâmetro mediano das NLC-PTX no dia 0, 30, 60 e 90, determinado por LD.

As duas técnicas utilizadas para a determinação do tamanho das NPs não apresentaram resultados concordantes. Este facto pode ser justificado pelo fundamento do método de cada uma ser diferente bem como a gama de tamanhos, que cada uma deteta. Sendo a LD, um método que deteta partículas com um intervalo de tamanho superior à DLS, a primeira técnica pode ser considerada como um método mais fiável. Sendo assim, as NLC com fármaco demonstraram ser mais estáveis ao longo do tempo do que as SLN contendo fármaco.

Um outro parâmetro importante na avaliação da estabilidade é o potencial zeta. Os resultados obtidos (apresentados anteriormente) no dia da preparação foram satisfatórios, uma vez que foram elevados em valor absoluto. Contudo, foi importante analisar se estes bons resultados se mantinham ao longo do tempo. O potencial zeta das SLN, sem e com PTX não foi diferente ao longo do tempo (Figura 51 e Figura 52, respetivamente), contudo nas NLC sem PTX o potencial zeta ao fim de 60 dias diminuiu (em valor absoluto) (Figura 53). Nas NLC com PTX, o potencial zeta também diminuiu (em módulo) ao fim de 60 dias, contudo retomou passado 30 dias (dia 90) (Figura 54). Assim, as NLC demonstram menor estabilidade uma vez que o potencial zeta diminuiu. Contudo durante o estudo o elétrodo usado para esta análise estava em mau estado pelo que depois foi substituído. Este facto pode ter influenciado os resultados, comprometendo as conclusões.

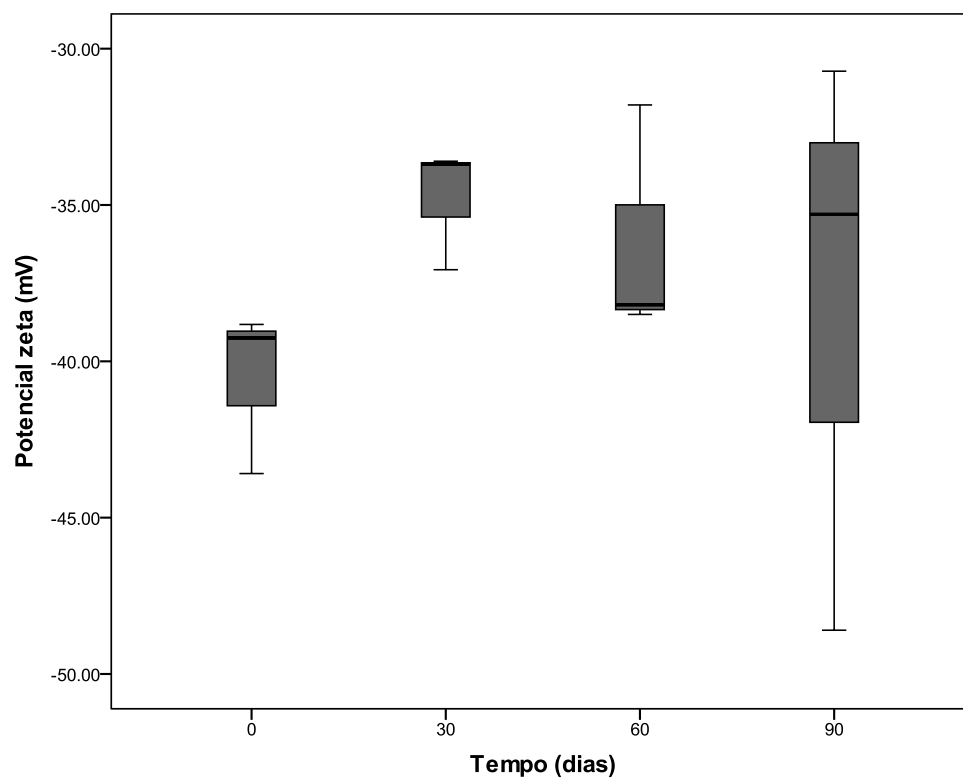


Figura 51: Potencial zeta das SLN dia 0, 30, 60 e 90. $p > 0,05$.

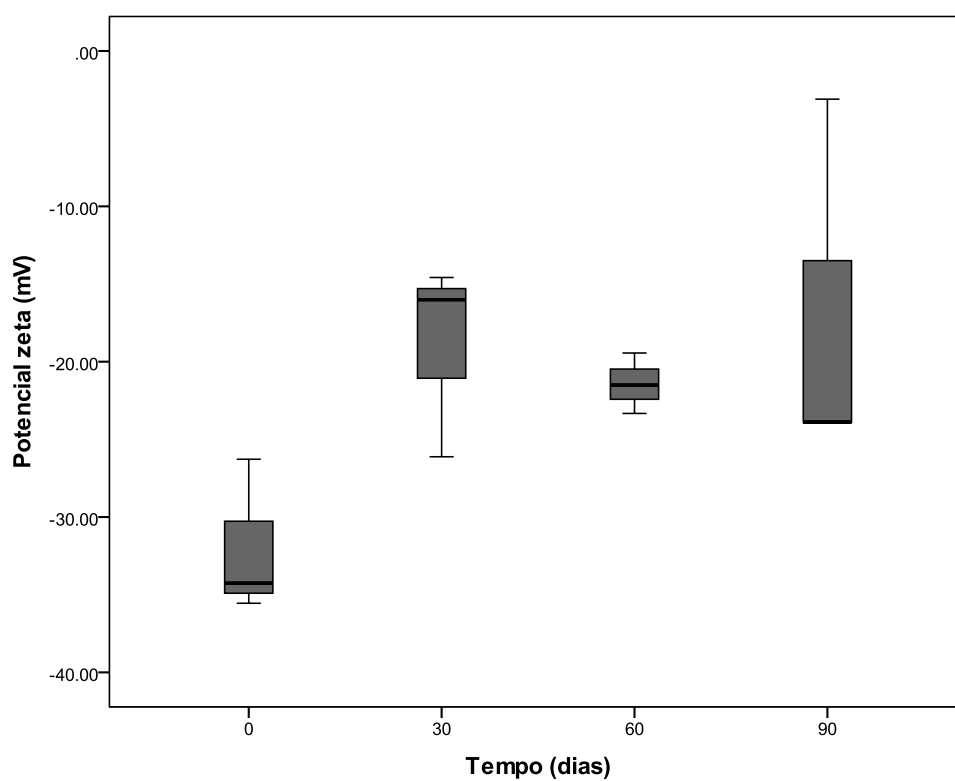


Figura 52: Potencial zeta das SLN- PTX dia 0, 30, 60 e 90. $p > 0,05$.

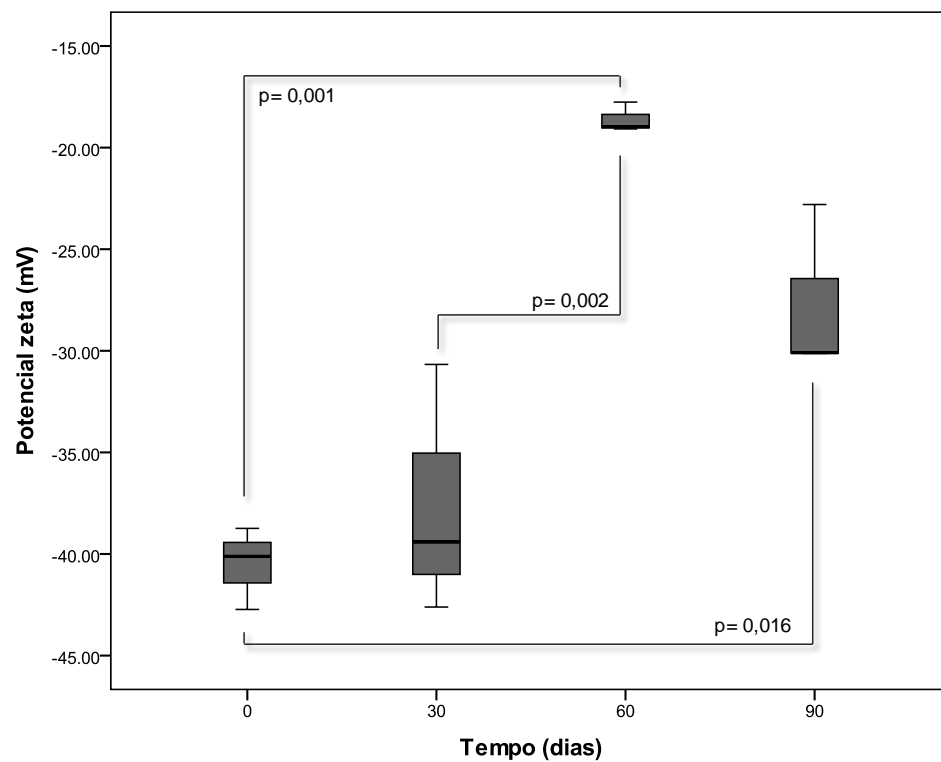


Figura 53: Potencial zeta das NLC dia 0, 30, 60 e 90. $p > 0,05$.

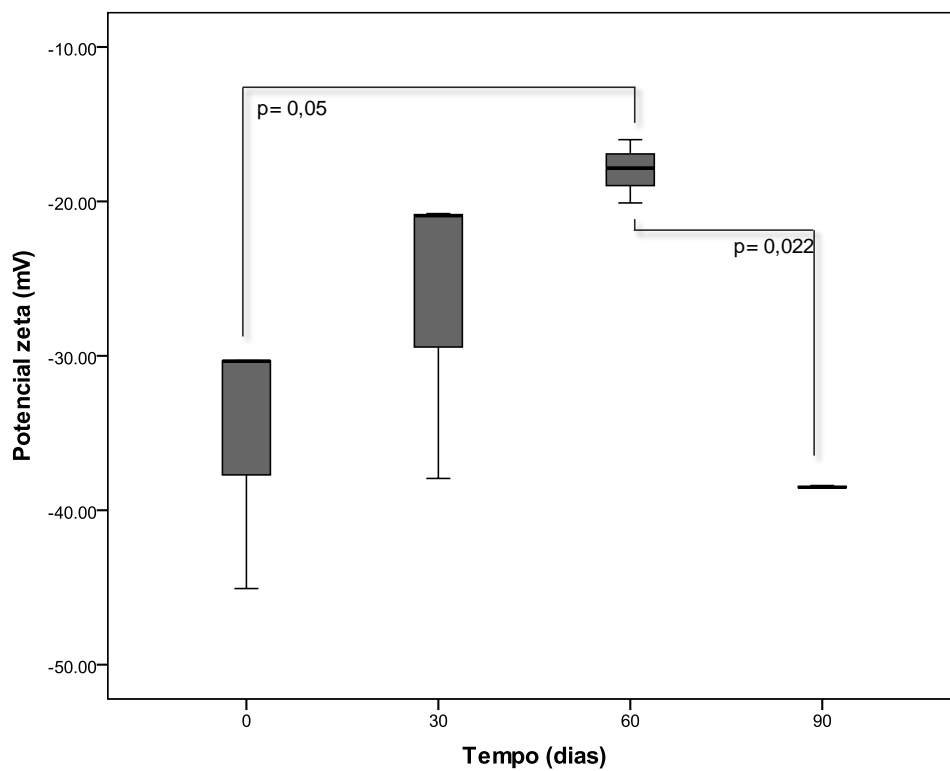


Figura 54: Potencial zeta das NLC-PTX dia 0, 30, 60 e 90.

O IR das NPs em estudo foi determinado no dia 0, 15 e 60 dias após a preparação das mesmas. Na Tabela 11 encontram-se os resultados da avaliação das NPs por DSC, ao longo do tempo. O IR das SLN com e sem PTX, passados 15 dias da preparação, aumentou, sendo que este aumento não se perpetua até ao 60ºdia. Relativamente às NLC, verificou-se um aumento do IR ao longo de todo o tempo de estudo. Comparando as SLN e as NLC ao longo do tempo, quando têm o PTX incorporado, as SLN apresentaram um IR superior à das NLC. Este facto traduz-se numa menor estabilidade das SLN para armazenar PTX, relativamente às NLC, estando este resultado de acordo com a informação descrita na literatura.

Tabela 11: Registo dos parâmetros da análise de DSC para as diferentes formulações, ao longo do tempo.

	Tempo (dias)		Onset (°C)	Entalpia (J/g)	IR (%)
SLN	0		50,1	-156,1	88,5
	15		49,8	-168,6	95,6
	60		49,9	-166,2	94,3
SLN-PTX	0		49,8	-164,6	93,4
	15		49,7	-165,9	94,1
	60		50,1	-165,7	94,0
NLC	0	A	-8,6	-84,3	-
		B	45,5	-161,6	91,7
	15	A	-8,6	-79,8	-
		B	45,8	-164,5	93,3
	60	A	-8,7	-58,9	-
		B	46,1	-174,6	99,0
NLC-PTX	0	A	-8,8	-100,3	-
		B	44,6	-139,9	79,3
	15	A	-9,3	-106,1	-
		B	44,1	-137,6	78,0
	60	A	-8,9	-96,0	-
		B	45,3	-148,6	84,3

A EI das NPs foi determinada no dia da preparação das mesmas e 30 dias após a preparação. Os resultados demonstram que, a EI das SLN e das NLC não sofreu alterações ao fim de 30 dias (Figura 55 e Figura 56, respetivamente).

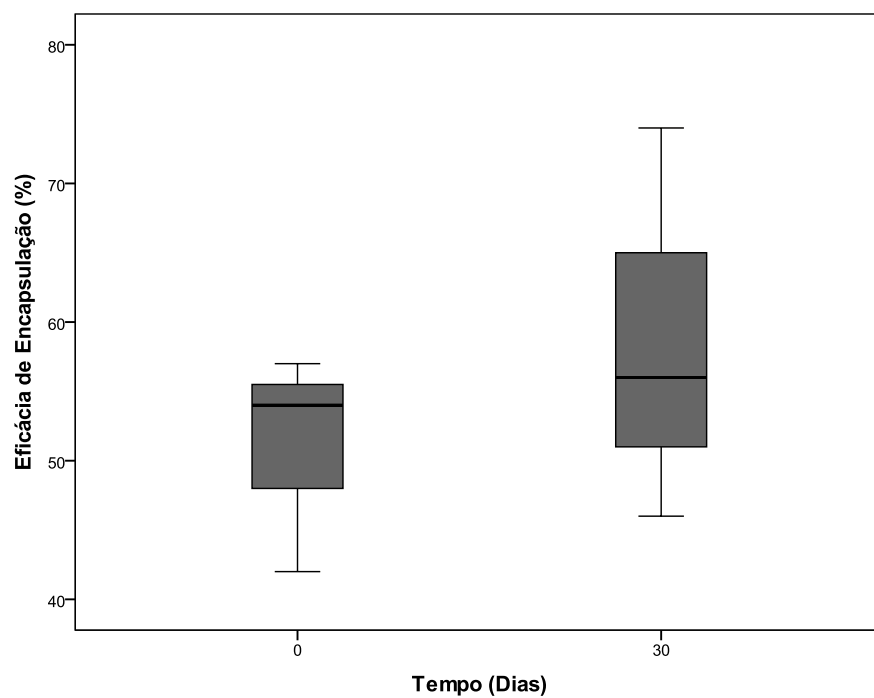


Figura 55: Eficácia de encapsulação do paclitaxel nas SLN no dia da preparação (dia 0) e após 30 dias. $p=0,460$.

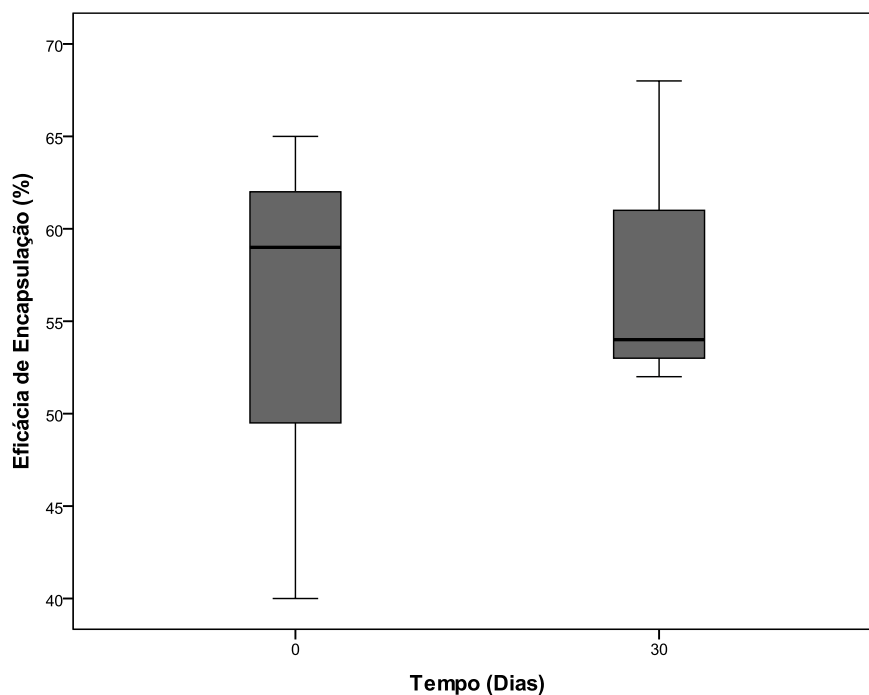


Figura 56: Eficácia de encapsulação do paclitaxel nas NLC no dia da preparação (dia 0) e após 30 dias. $p= 0,732$.

Tendo em conta os resultados obtidas acerca da estabilidade (tamanho e IR), seria espectável que as SLN apresentassem uma EI menor do que as NLC, contudo o tempo de análise foi inferior ao tempo para a qual as NLC demonstraram ser mais estáveis (60 dias). Para uma melhor conclusão, o ideal seria prolongar o tempo de análise, até pelo menos, 60 dias.

4 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O cancro é uma doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo e uma das principais preocupações ao nível da saúde pública. Um enorme investimento financeiro e de recursos de saúde tem sido feito nos últimos anos para a sua deteção, prevenção e tratamento. Caracteriza-se pelo crescimento descontrolado das células e pela capacidade de metastização. Existem inúmeros tipos de cancro e a sua terminologia depende do tipo/localização das células que sofrem crescimento descontrolado. Os gliomas resultam de um crescimento descontrolado das células gliais e constituem cerca de metade de todos os tumores cerebrais malignos.

São vários os anticancerígenos, já comercializados, que atingem o sistema nervoso central mas apenas em quantidades insignificantes, devido essencialmente, à presença da barreira hematoencefálica. O paclitaxel é um desses fármacos e apesar de ser utilizado no tratamento de inúmeros cancros apresenta inúmeras desvantagens, como efeitos secundários graves, baixa solubilidade em meio aquoso e baixa permeabilidade. Estas desvantagens foram contornadas recorrendo à vetorização com nanopartículas (Abraxane™- nanopartículas de albumina contendo paclitaxel). Apesar do sucesso desta nova formulação, a investigação científica continuou a dedicar-se à descoberta de novas formulações com base em nanopartículas.

As nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) são geralmente descritas como vantajosas face a outro tipo de nanopartículas, por apresentarem menor toxicidade, maior facilidade de controlar a libertação do fármaco. Apesar das vantagens destas nanopartículas, as NLC surgiram para combater a principal desvantagem das SLN, a possibilidade de ocorrer a expulsão do fármaco, durante o armazenamento devido à sua estrutura cristalina. Face a tudo isto, as SLN e as NLC foram alvo de estudo, a fim de determinar qual seriam as melhores para incorporar o paclitaxel.

Os resultados demonstraram que as nanopartículas preparadas com 5% de lípido apresentaram um tamanho mediano inferior à das nanopartículas preparadas com 10% de lípido. A homogeneização a alta pressão permitiu a obtenção de nanopartículas com um tamanho mediano inferior, relativamente à homogeneização a alta velocidade. O tamanho mediano/médio das SLN e NLC não sofreu alteração aquando da incorporação do paclitaxel, bem como a morfologia, a estrutura interna e o potencial zeta. Assim, pode-se concluir que a incorporação do paclitaxel não altera as características das nanopartículas. As SLN com PTX apresentaram um índice de recristalização superior às NLC com PTX, uma menor estabilidade ao longo do tempo em termos de tamanho,

levando a concluir que as NLC serão uma potencial formulação para veicular o paclitaxel. Contudo, o potencial zeta das NLC com PTX, ao longo do tempo, diminuiu (em valor absoluto). Em relação à eficácia de encapsulação, não houve diferenças entre as SLN e NLC.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a homogeneização a alta pressão e 5% de lípido levaram à produção de nanopartículas mais pequenas do que o método de homogeneização a alta velocidade e 10% lípido. Também se pode concluir que, as NLC seriam um melhor sistema para vetorizar o paclitaxel, uma vez que apresentam melhores resultados na estabilidade da formulação.

Estando este estudo numa fase ainda preliminar, num próximo passo seria interessante avaliar a citotoxicidade das SLN e NLC desenvolvidas, bem como a sua capacidade de permeação num modelo *in vitro* ou *in vivo* que mimetize a barreira hematoencefálica.

5 ANEXOS

Glossário da validação do método analítico

Amplitude – Geralmente determinada a partir dos estudos de linearidade e depende do objetivo do método analítico.

Especificidade – capacidade de determinar um analito na presença de outras substâncias suscetíveis de estarem presentes na amostra.

Exatidão – Expressa a proximidade entre o valor encontrado e um valor aceite como valor de referência.

Limite de detecção – Menor quantidade de analito que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor exato.

Limite de quantificação – Menor quantidade de analito numa amostra que pode ser quantitativamente determinado com a precisão e exatidão adequadas.

Linearidade – Capacidade (numa determinada amplitude) de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

Precisão – Medida de proximidade dos valores, uns em relação aos outros para um certo número de determinações nas mesmas condições analíticas.

Precisão intermédia – Medida da precisão determinada nas melhores condições experimentais possíveis, isto é, o mesmo analista, o mesmo equipamento, pequena variação de tempo, etc.

Repetibilidade – Medida da precisão determinada com uma alteração, diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos, etc.

Reprodutibilidade – Medida da precisão determinada em estudos inter-laboratoriais.

Seletividade – Possibilidade de um analito particular ser determinado numa mistura, sem a interferência dos outros componentes.

Doseamento do paclitaxel

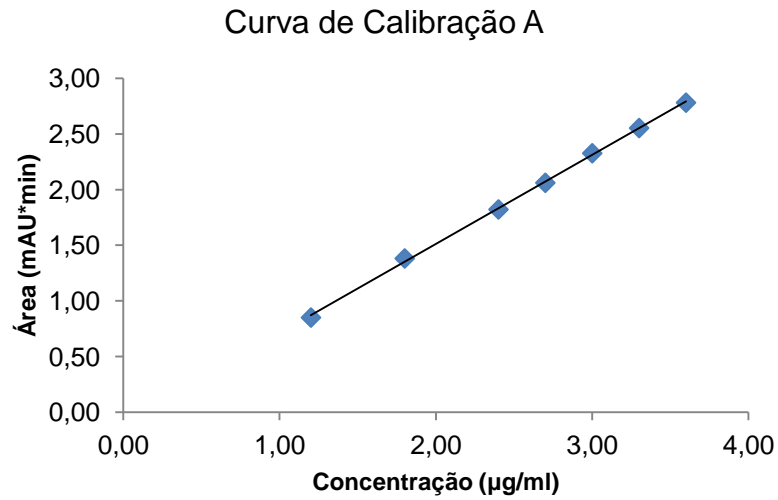


Figura 57: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,8005x - 0,0902$; $R^2 = 0,9993$ e $SQD = 0,0019$.

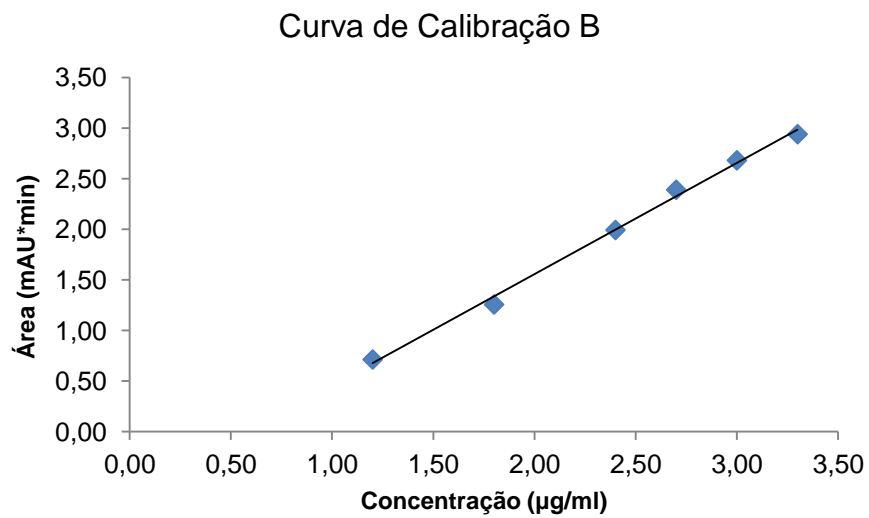


Figura 58: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 1,0982x - 0,6406$; $R^2 = 0,9961$ e $SQD = 0,014$.

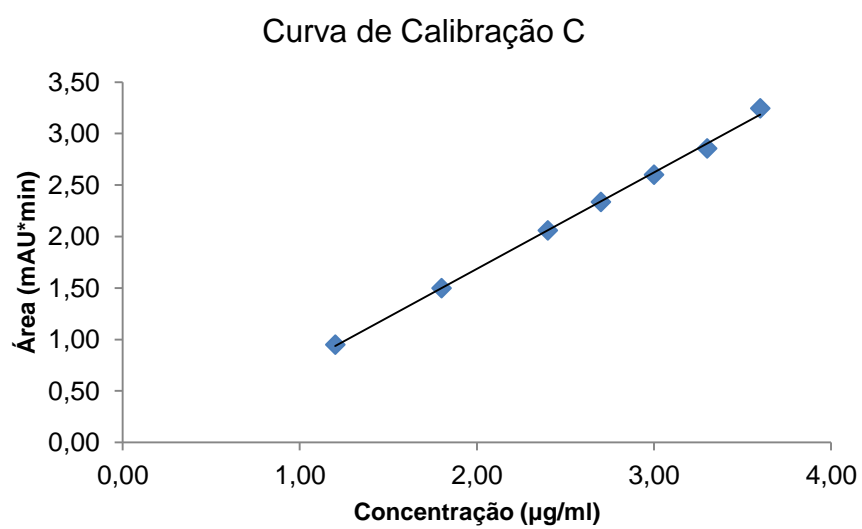


Figura 59: Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,9367x - 0,1883$; $R^2 = 0,9982$ e $SQD = 0,0067$.

Caracterização das Nanopartículas

Tabela 12: Registo do tamanho mediano e médio (Dv e DM, respetivamente), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (PZ) e eficácia de encapsulação (EE).

	Método	Velocidade de agitação ultra-turrax (rpm)	Formulação	Tamanho (nm)			IP ± DP	PZ ± DP	EE (%) ± DP	
				Dv ± DP						DM ± DP
				Dv10	Dv50	Dv90				
SLN	Ultrassons	13500	5% Lípido	114,5 ± 0,7	276,5 ± 4,9	895 ± 79,2	-	-	-	
			10% Lípido	313,3 ± 41,0	678,5 ± 84,7	1995 ± 459,6	-	-	-	
	HAP a quente	8000	5% Lípido	89,4 ± 1,9	201,3 ± 7,8	768,7 ± 94,9	181,1 ± 5,0	0,118 ± 0,062	- 40,6 ± 2,7	-
			5% Lípido + 0,1% PTX	102,9 ± 7,4	229,0 ± 21,0	761,0 ± 205,4	186,7 ± 8,9	0,176 ± 0,026	- 32,0 ± 5,9	51 ± 0,078
		13500	5% Lípido	89,7 ± 6,5	204,7 ± 23,7	876,7 ± 213,7	-	-	-	-
			10% Lípido	95,7 ± 3,2	212,7 ± 9,3	751,3 ± 221,2	-	-	-	-
NLC	Ultrassons	13500	5% Lípido	94,0 ± 0,2	210,3 ± 1,5	644,7 ± 56,9	-	-	-	-
			10% Lípido	145,0 ± 26,5	397,0 ± 39,6	2086,7 ± 253,2	-	-	-	-
	HAP a quente	8000	5% Lípido	100,4 ± 2,3	215,7 ± 5,1	1520 ± 170,6	185,1 ± 5,6,49	0,151 ± 0,046	- 40,5 ± 2,4	-
			5% Lípido + 0,1% PTX	109,3 ± 6,1	252,7 ± 20,8	1670,0 ± 242,7	183,2 ± 14,3	0,145 ± 0,029	- 34,4 ± 8,8	55 ± 0,126
		13500	5% Lípido	90,8 ± 1,5	212,7 ± 3,5	1550,0 ± 43,6	-	-	-	-
			10% Lípido	90,7 ± 1,6	215,3 ± 5,7	1503,3 ± 126,6	-	-	-	-

DSC (estabilidade)

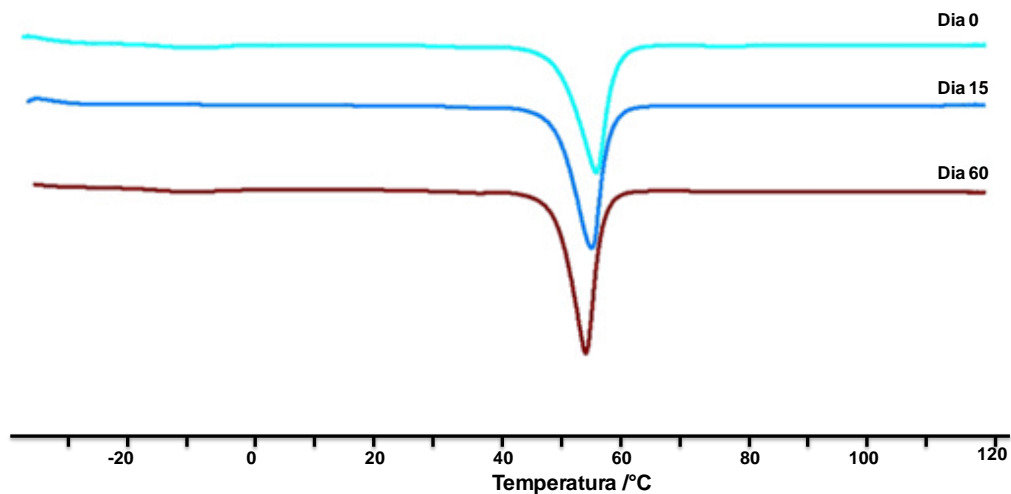


Figura 60: Termograma das SLN no dia 0, 15 e 60.

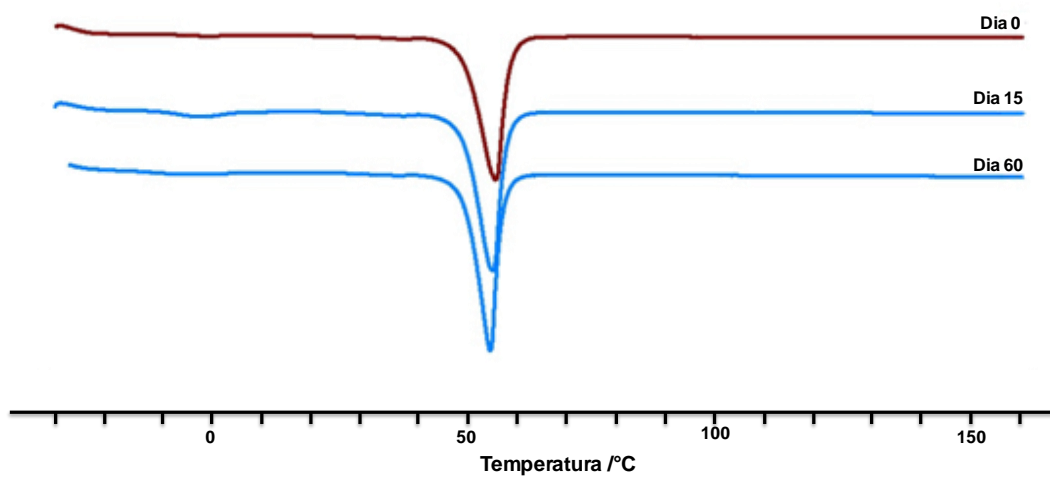


Figura 61: Termograma das SLN-PTX no dia 0, 15 e 60.

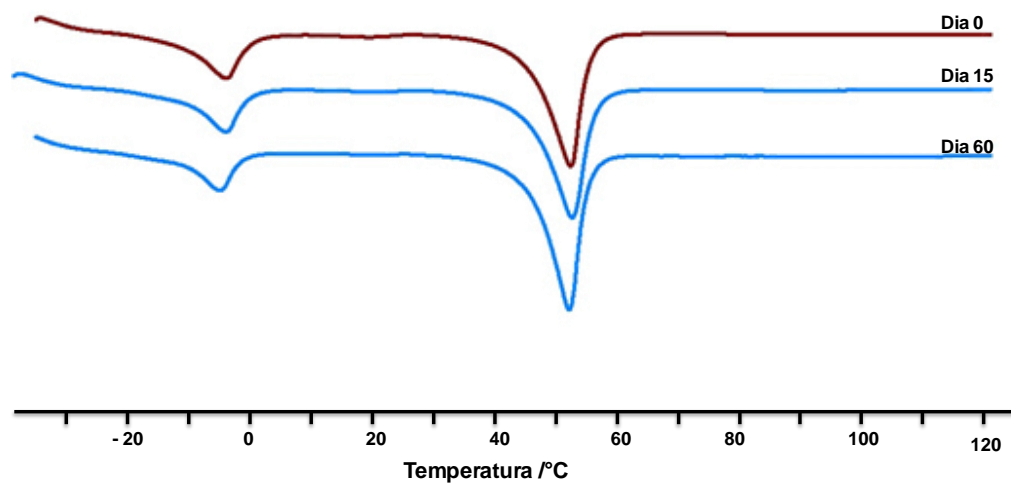


Figura 62: Termograma das NLC no dia 0, 15 e 60.

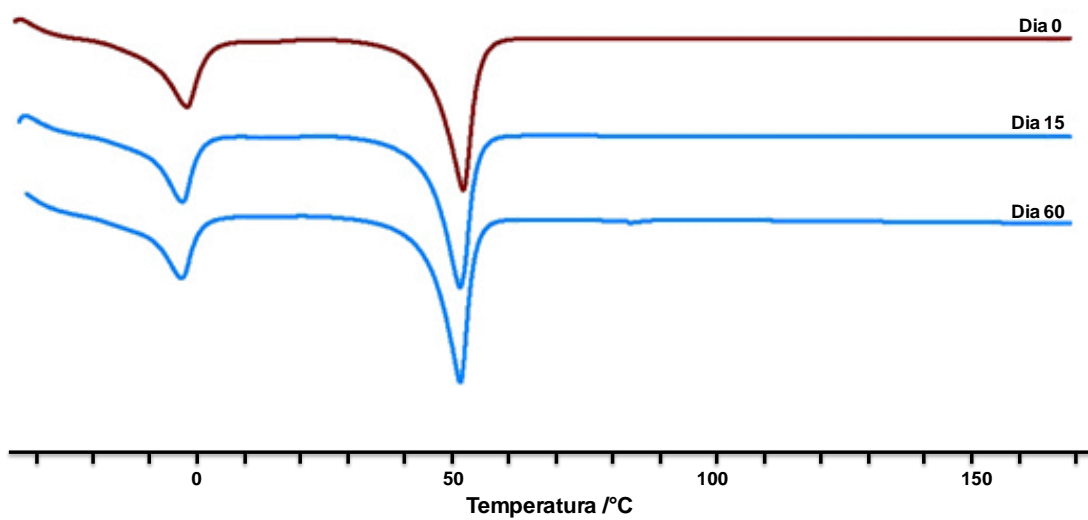


Figura 63: Termograma das NLC-PTX no dia 0, 15 e 60.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med. 2000;21(6):167-223.
2. Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2015;93:52-79.
3. Ruddon RW. Cancer Biology. FOURTH EDITION ed: OXFORD University Press; 2007.
4. Qiu B, Simon MC, editors. Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis. Seminars in cell & developmental biology; 2015: Elsevier.
5. What is cancer? National Cancer Institute at the National Institutes of Health [cited 2015 29-08-15]. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>.
6. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. Journal of drug targeting. 2015:1-13.
7. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. 2013 [29-08-2015]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
8. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>.
9. David Randall WB, Kathleen French. Eckert-Animal Physiology. Edition 5 ed. England: W. H. Freeman and Company; 2001.
10. Kortmann RD, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M. Radiochemotherapy of malignant glioma in adults. Clinical experiences. Strahlenther Onkol. 2003;179(4):219-32.
11. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol. 1993;3(3):255-68.
12. Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. Mol Ther. 2005;12(4):585-98.
13. Tzeng SY, Green JJ. Therapeutic nanomedicine for brain cancer. Ther Deliv. 2013;4(6):687-704.

14. Legler JM, Ries LAG, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, et al. Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(16):1382-90.
15. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *Journal of nanomedicine & nanotechnology*. 2013;4(2):1000164.
16. Li R, Eun JS, Lee MK. Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel loaded in pegylated solid lipid nanoparticles after intravenous administration. *Archives of pharmacal research*. 2011;34(2):331-7.
17. Pandita D, Ahuja A, Lather V, Benjamin B, Dutta T, Velpandian T, et al. Development of lipid-based nanoparticles for enhancing the oral bioavailability of paclitaxel. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):712-22.
18. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*. 2002;235(1-2):179-92.
19. Marupudi NI, Han JE, Li KW, Renard VM, Tyler BM, Brem H. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert opinion on drug safety*. 2007;6(5):609-21.
20. Panchagnula R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International journal of pharmaceutics*. 1998;172(1-2):1-15.
21. Zabaleta V, Ponchel G, Salman H, Agueros M, Vauthier C, Irache JM. Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles: permeability and pharmacokinetic study. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2012;81(3):514-23.
22. Stevens DM, Gilmore KA, Harth E. An assessment of nanosponges for intravenous and oral drug delivery of BCS class IV drugs: Drug delivery kinetics and solubilization. *Polymer Chemistry*. 2014;5(11):3551.
23. DrugBank. Paclitaxel [28-09-2015]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01229>.
24. Bocci G, Di Paolo A, Danesi R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis*. 2013;16(3):481-92.
25. methodology Wccfds. Updates included in the ATC/DDD index [28-09-2015]. Available from: http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=L01CD01.
26. Rowinsky EK. Clinical pharmacology of Taxol. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 1993(15):25-37.
27. Zhang Z, Mei L, Feng SS. Paclitaxel drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*. 2013;10(3):325-40.

28. Edward Chu VTD. Physicians Cancer Chemotherapy Drug Manual 2008: Jones and Bartlett Publishers; 2008.
29. Chiang PC, Gould S, Nannini M, Qin A, Deng Y, Arrazate A, et al. Nanosuspension delivery of paclitaxel to xenograft mice can alter drug disposition and anti-tumor activity. *Nanoscale research letters*. 2014;9(1):156.
30. Varma MV, Khandavilli S, Ashokraj Y, Jain A, Dhanikula A, Sood A, et al. Biopharmaceutic classification system: a scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research. *Current drug metabolism*. 2004;5(5):375-88.
31. Karunakar BBKR. Biopharmaceutics Classification System: A Regulatory Approach. *Dissolution Technologies*. 2011:31-7.
32. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995;12(3):413-20.
33. Varma MV, Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: effect on solubility and permeability in vitro, in situ and in vivo. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2005;25(4-5):445-53.
34. Hedaya MA. *Basic Pharmacokinetics*. Second Edition ed: Taylor & Francis Group; 2012.
35. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed research international*. 2015;2015:413076.
36. Tamura T, Sasaki Y, Nishiwaki Y, Saijo N. Phase I study of paclitaxel by three-hour infusion: hypotension just after infusion is one of the major dose-limiting toxicities. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1995;86(12):1203-9.
37. Jang SH, Wientjes MG, Au JL. Determinants of paclitaxel uptake, accumulation and retention in solid tumors. *Investigational new drugs*. 2001;19(2):113-23.
38. Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, Dutcher JP, Lipton RB, Paietta E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer research*. 1987;47(9):2486-93.
39. Huizing MT, Vermorken JB, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Mandjes I, Pinedo HM, et al. Pharmacokinetics of paclitaxel and three major metabolites in patients with advanced breast carcinoma refractory to anthracycline therapy treated with a 3-hour paclitaxel infusion: a European Cancer Centre (ECC) trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1995;6(7):699-704.
40. Ohtsu T, Sasaki Y, Tamura T, Miyata Y, Nakanomyo H, Nishiwaki Y, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel: a 3-hour infusion versus a 24-

hour infusion. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;1(6):599-606.

41. Joel G. Hardman LEL. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10ª Edição ed: McGraw Hill Companies; 2005.

42. Schrijvers D, Highley M, De Bruyn E, Van Oosterom AT, Vermorken JB. Role of red blood cells in pharmacokinetics of chemotherapeutic agents. *Anti-cancer drugs*. 1999;10(2):147-53.

43. Rizzo J, Riley C, von Hoff D, Kuhn J, Phillips J, Brown T. Analysis of anticancer drugs in biological fluids: determination of taxol with application to clinical pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1990;8(2):159-64.

44. Howat S, Park B, Oh IS, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New biotechnology*. 2014;31(3):242-5.

45. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(3):1561-5.

46. Walczak CE, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(2):91-102.

47. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69(1):277-302.

48. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003;22(47):7280-95.

49. Ganguly A, Yang H, Cabral F. Paclitaxel-dependent cell lines reveal a novel drug activity. *Molecular cancer therapeutics*. 2010;9(11):2914-23.

50. Wang F, Cao Y, Zhao W, Liu H, Fu Z, Han R. Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression. *Journal of pharmacological sciences*. 2003;93(2):197-203.

51. Giannakakou P, Robey R, Fojo T, Blagosklonny MV. Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene*. 2001;20(29):3806-13.

52. Portney NG, Ozkan M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;384(3):620-30.

53. Sun S, Schiller JH, Spinola M, Minna JD. New molecularly targeted therapies for lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):2740-50.

54. Videira MA, Arranja AG, Gouveia LF. Experimental design towards an optimal lipid nanosystem: a new opportunity for paclitaxel-based therapeutics. *European journal of*

pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2013;49(2):302-10.

55. Sevko A, Kremer V, Falk C, Umansky L, Shurin MR, Shurin GV, et al. Application of paclitaxel in low non-cytotoxic doses supports vaccination with melanoma antigens in normal mice. *Journal of immunotoxicology*. 2012;9(3):275-81.

56. Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer research*. 1997;57(1):81-6.

57. Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, et al. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clinical Cancer Research*. 1996;2(11):1843-9.

58. Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer research*. 2007;67(8):3512-7.

59. Hadzic T, Aykin-Burns N, Zhu Y, Coleman MC, Leick K, Jacobson GM, et al. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H₂O₂-mediated oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;48(8):1024-33.

60. Chen DB, Yang TZ, Lu WL, Zhang Q. In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2001;49(11):1444-7.

61. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharmaceutical research*. 2006;23(6):1243-50.

62. ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clinical pharmacokinetics*. 2003;42(7):665-85.

63. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*. 2001;37(13):1590-8.

64. Sparreboom A, van Tellingen O, Nooijen WJ, Beijnen JH. Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. *Cancer research*. 1996;56(9):2112-5.

65. van Tellingen O, Huizing MT, Panday VR, Schellens JH, Nooijen WJ, Beijnen JH. Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients. *British journal of cancer*. 1999;81(2):330-5.

66. Lytton-Jean AK, Kauffman KJ, Kaczmarek JC, Langer R. Cancer nanotherapeutics in clinical trials. *Cancer treatment and research*. 2015;166:293-322.
67. Hennenfent KL, Govindan R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2006;17(5):735-49.
68. Neil I. Nab technology: A drug delivery platform utilising endothelial gp60 receptor-based transport and tumour-derived SPARC for targeting. 2007.
69. Agency EM. Annex 1- Summary of Product characteristics 2015 [18-09-2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000778/human_med_000620.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
70. Ibrahim NK, Desai N, Legha S, Soon-Shiong P, Theriault RL, Rivera E, et al. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(5):1038-44.
71. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(31):7794-803.
72. Svenson S. What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles? *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2014;6(2):125-35.
73. Slingerland M, Guchelaar HJ, Rosing H, Scheulen ME, van Warmerdam LJ, Beijnen JH, et al. Bioequivalence of Liposome-Entrapped Paclitaxel Easy-To-Use (LEP-ETU) formulation and paclitaxel in polyethoxylated castor oil: a randomized, two-period crossover study in patients with advanced cancer. *Clinical therapeutics*. 2013;35(12):1946-54.
74. Gross N, Ranjbar M, Evers C, Hua J, Martin G, Schulze B, et al. Choroidal neovascularization reduced by targeted drug delivery with cationic liposome-encapsulated paclitaxel or targeted photodynamic therapy with verteporfin encapsulated in cationic liposomes. *Molecular vision*. 2013;19:54-61.
75. Ahn HK, Jung M, Sym SJ, Shin DB, Kang SM, Kyung SY, et al. A phase II trial of Cremophor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;74(2):277-82.
76. Werner ME, Cummings ND, Sethi M, Wang EC, Sukumar R, Moore DT, et al. Preclinical evaluation of Genexol-PM, a nanoparticle formulation of paclitaxel, as a novel radiosensitizer for the treatment of non-small cell lung cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;86(3):463-8.

77. Development-Pipeline N-Ra. 2013 [03/09/15]. Available from: <http://www.nanocarrier.co.jp/en/research/pipeline/index.html>.
78. Kato K, Chin K, Yoshikawa T, Yamaguchi K, Tsuji Y, Esaki T, et al. Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Investigational new drugs*. 2012;30(4):1621-7.
79. Cancer PoPPoOiTPWSIoSIOEoPCoFT. cti Biopharma; 2014 [03/09/15]. Available from: <http://www.ctibiopharma.com/clinical-trials/trials-compound/>.
80. Alphandery E, Grand-Dewyse P, Lefevre R, Mandawala C, Durand-Dubief M. Cancer therapy using nanoformulated substances: scientific, regulatory and financial aspects. *Expert review of anticancer therapy*. 2015;15(10):1233-55.
81. Bedikian AY, DeConti RC, Conry R, Agarwala S, Papadopoulos N, Kim KB, et al. Phase 3 study of docosahexaenoic acid-paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(4):787-93.
82. Homsí J, Bedikian AY, Kim KB, Papadopoulos NE, Hwu WJ, Mahoney SL, et al. Phase 2 open-label study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel in cutaneous and mucosal metastatic melanoma patients. *Melanoma research*. 2009;19(4):238-42.
83. Fang CL, Al-Suwayeh SA, Fang JY. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Recent patents on nanotechnology*. 2013;7(1):41-55.
84. Pardeshi C, Rajput P, Belgamwar V, Tekade A, Patil G, Chaudhary K, et al. Solid lipid based nanocarriers: an overview. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*. 2012;62(4):433-72.
85. Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54 Suppl 1:S131-55.
86. Hashim AA. Drug Nanoparticles - An Overview. In: Vijaykumar Nekkanti VVaRP, editor. *The Delivery of Nanoparticles: INTECH*; 2012. p. 111 - 32.
87. Nagavarma B V N HKSY, Ayaz A, Vasudha L.S, Shivakumar H.G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2012;5(3):16-23.
88. Battaglia L, Gallarate M, Cavalli R, Trotta M. Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. *Journal of microencapsulation*. 2010;27(1):78-85.
89. Kumar S, Randhawa JK. High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2013;33(4):1842-52.
90. Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society reviews*. 2012;41(7):2545-61.

91. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2008;5(4):505-15.
92. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2012;8(2):147-66.
93. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(9):1790-8.
94. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47(2-3):165-96.
95. Martins S, Tho I, Souto E, Ferreira D, Brandl M. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2012;45(5):613-23.
96. Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2000;50(1):161-77.
97. Lopes EBS e CM. *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, Portugal: Edições Universidade Fernando Pessoa; 2011.
98. Souto E, Almeida A, Müller R. Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2007;3(4):317-31.
99. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(26):4127-36.
100. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
101. Parney IF, Chang SM. Current chemotherapy for glioblastoma. *Cancer J*. 2003;9(3):149-56.
102. Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):264-73.
103. Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, Saltzman WM. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(7):701-5.

104. DosSantos MF, Holanda-Afonso RC, Lima RL, DaSilva AF, Moura-Neto V. The role of the blood-brain barrier in the development and treatment of migraine and other pain disorders. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:302.
105. Patel M, Souto EB, Singh KK. Advances in brain drug targeting and delivery: limitations and challenges of solid lipid nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery.* 2013;10(7):889-905.
106. Gaillard AGdBaPJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:323-55.
107. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):1-13.
108. Deeken JF, Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(6):1663-74.
109. Widmair EP, Raff, H., Strang, K.T. *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function.* 10th edition ed. New York: McGraw-Hill International Edition; 2006.
110. Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22(1):11-28.
111. Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):591-602.
112. Wu M, Fan Y, Lv S, Xiao B, Ye M, Zhu X. Vincristine and temozolomide combined chemotherapy for the treatment of glioma: a comparison of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for dual drugs delivery. *Drug Deliv.* 2015:1-6.
113. Hernandez-Pedro NY, Rangel-Lopez E, Magana-Maldonado R, de la Cruz VP, del Angel AS, Pineda B, et al. Application of nanoparticles on diagnosis and therapy in gliomas. *BioMed research international.* 2013;2013:351031.
114. Nance E, Zhang C, Shih TY, Xu Q, Schuster BS, Hanes J. Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration. *ACS Nano.* 2014;8(10):10655-64.
115. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society reviews.* 2012;41(7):2971-3010.
116. Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2001;74(1-3):7-25.
117. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and

microenvironment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(8):4607-12.

118. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. Nano Today. 2007;2(3):14-21.

119. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. Frontiers in pharmacology. 2014;5:77.

120. Koziara JM, Lockman PR, Allen DD, Mumper RJ. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2004;99(2):259-69.

121. Nance EA, Woodworth GF, Sailor KA, Shih T-Y, Xu Q, Swaminathan G, et al. A dense poly (ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. Science translational medicine. 2012;4(149):149ra19-ra19.

122. Martins SM, Sarmiento B, Nunes C, Lucio M, Reis S, Ferreira DC. Brain targeting effect of camptothecin-loaded solid lipid nanoparticles in rat after intravenous administration. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2013;85(3 Pt A):488-502.

123. Martins S, Tho I, Reimold I, Fricker G, Souto E, Ferreira D, et al. Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: formulation design, in vitro and in vivo studies. International journal of pharmaceutics. 2012;439(1-2):49-62.

124. Shi K, Zhou J, Zhang Q, Gao H, Liu Y, Zong T, et al. Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Modified Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Docetaxel Delivery in Glioblastoma Multiforme. J Biomed Nanotechnol. 2015;11(3):382-91.

125. Arshad A, Yang B, Bienemann AS, Barua NU, Wyatt MJ, Woolley M, et al. Convection-Enhanced Delivery of Carboplatin PLGA Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma. PloS one. 2015;10(7):e0132266.

126. Zhao J, Zhang B, Shen S, Chen J, Zhang Q, Jiang X, et al. CREKA peptide-conjugated dendrimer nanoparticles for glioblastoma multiforme delivery. Journal of colloid and interface science. 2015;450:396-403.

127. Wu J, Zhao J, Zhang B, Qian Y, Gao H, Yu Y, et al. Polyethylene glycol-poly(lactic acid) nanoparticles modified with cysteine-arginine-glutamic acid-lysine-alanine fibrin-homing peptide for glioblastoma therapy by enhanced retention effect. International journal of nanomedicine. 2014;9:5261-71.

128. Dhami NK, Pandey RS, Jain UK, Chandra R, Madan J. Non-aggregated protamine-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles of cisplatin crossed blood-brain barrier, enhanced drug delivery and improved therapeutic index in glioblastoma cells: in vitro studies. J Microencapsul. 2014;31(7):685-93.

129. Gao H, Zhang S, Yang Z, Cao S, Jiang X, Pang Z. In vitro and in vivo intracellular distribution and anti-glioblastoma effects of docetaxel-loaded nanoparticles functioned with IL-13 peptide. *International journal of pharmaceutics*. 2014;466(1-2):8-17.
130. Yuan H, Miao J, Du Y-Z, You J, Hu F-Q, Zeng S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *International journal of pharmaceutics*. 2008;348(1):137-45.
131. Feng X, Gao X, Kang T, Jiang D, Yao J, Jing Y, et al. Mammary-Derived Growth Inhibitor Targeting Peptide-Modified PEG-PLA Nanoparticles for Enhanced Targeted Glioblastoma Therapy. *Bioconjugate chemistry*. 2015;26(8):1850-61.
132. Mu Q, Jeon M, Hsiao MH, Patton VK, Wang K, Press OW, et al. Stable and efficient Paclitaxel nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(8):1236-45.
133. Chirio D, Gallarate M, Peira E, Battaglia L, Muntoni E, Riganti C, et al. Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2014;88(3):746-58.
134. Jiang X, Xin H, Ren Q, Gu J, Zhu L, Du F, et al. Nanoparticles of 2-deoxy-D-glucose functionalized poly(ethylene glycol)-co-poly(trimethylene carbonate) for dual-targeted drug delivery in glioma treatment. *Biomaterials*. 2014;35(1):518-29.
135. Smith ABaFJ. *Chromatographic Methods*: Kluwer Academic Publisher; 1999.
136. Meyer VR. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Fifth Edition ed: Wiley; 2010.
137. Administration FaD. *Reviewer Guidance - Validation of Chromatographic Methods*. 1994.
138. David B. Troy PB. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 21st Edition ed: Lippincott Williams & Wilkins.
139. Chust RB. Introdução à Cromatografia de Líquidos *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. 1990;39:43-54.
140. Mohammadi A, Esmaeili F, Dinarvand R, Atyabi F, Walker RB. Development and validation of a stability-indicating method for the quantitation of Paclitaxel in pharmaceutical dosage forms. *J Chromatogr Sci*. 2009;47(7):599-604.
141. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 2011;104(4):467-83.
142. Poncelet D. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. In: Blitz J, Gun'ko V, editors. *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*: Springer Netherlands; 2006. p. 23-34.

143. Costa PJC, Rocha-Santos T, Gomes AM, Pintado MM, Sousa S, Amaral MH, et al. Immobilization and Microencapsulation of Probiotics. In: Silva JPS, Freitas AC, editors. Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.; 2014. p. 171-226.
144. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2006;2(1):8-21.
145. Martins S, Tho I, Ferreira DC, Souto EB, Brandl M. Physicochemical properties of lipid nanoparticles: effect of lipid and surfactant composition. Drug development and industrial pharmacy. 2011;37(7):815-24.
146. Martins S, Costa-Lima S, Carneiro T, Cordeiro-da-Silva A, Souto EB, Ferreira DC. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. International journal of pharmaceutics. 2012;430(1-2):216-27.
147. Pinto MF, Moura CC, Nunes C, Segundo MA, Costa Lima SA, Reis S. A new topical formulation for psoriasis: development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. International journal of pharmaceutics. 2014;477(1-2):519-26.
148. Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2004;4(5):484-8.
149. Kreuter J, Petrov VE, Kharkevich DA, Alyautdin RN. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. Journal of Controlled Release. 1997;49(1):81-7.
150. Kelidari HR, Saeedi M, Akbari J, Morteza-Semnani K, Gill P, Valizadeh H, et al. Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2015;128:473-9.
151. Muller RH, Maassen S, Weyhers H, Mehnert W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. Journal of drug targeting. 1996;4(3):161-70.
152. Deepak Thassu MD, Yashwant Pathak. Nanoparticulate Drug Delivery. USA: Informa Healthcare; 2007.
153. Souto EB, Severino P, Santana MHA, Pinho SC. Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. Química Nova. 2011;34:1762-9.
154. Sebag J. Molecular biology of pharmacologic vitreolysis. Trans Am Ophthalmol Soc. 2005;103:473-94.
155. Michael E. Aulton KMG. Aulton's Pharmaceutics - the design and manufacture of medicines. Fourth edition ed: ELSEVIER; 2013.

156. Zvonar A, Kristl J, Kerc J, Grabnar PA. High celecoxib-loaded nanoparticles prepared by a vibrating nozzle device. *J Microencapsul.* 2009;26(8):748-59.
157. Hwang TL, Lin YK, Chi CH, Huang TH, Fang JY. Development and evaluation of perfluorocarbon nanobubbles for apomorphine delivery. *J Pharm Sci.* 2009;98(10):3735-47.
158. Almeida AJ, Runge S, Müller RH. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *International journal of pharmaceutics.* 1997;149(2):255-65.
159. Schaffazick SR, Pohlmann AR, Dalla-Costa T, Guterres SS. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV.* 2003;56(3):501-5.
160. Malvern. Zeta potential - An introduction in 30 minutes [11/09/2015]. Available from: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.aspx>.
161. Mishra PR, Al Shaal L, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International journal of pharmaceutics.* 2009;371(1):182-9.
162. Joseph Goldstein DEN, David Joy, Charles E. Lyman, Patrick Echlin, Eric Lifshin, Linda Sawyer, J.R. Michael. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Third Edition ed: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
163. Zhou W, Apkarian R, Wang Z, Joy D. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). In: Zhou W, Wang Z, editors. *Scanning Microscopy for Nanotechnology*: Springer New York; 2007. p. 1-40.
164. Iyer R, Arunagirinathan MA, Prabhu CS, Bellare J. An improved specimen loader for cryo-scanning electron microscopy. *Scanning.* 2005;27(3):141-6.
165. Fujikawa S, Endoh K. Cryo-scanning electron microscopy to study the freezing behavior of plant tissues. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2014;1166:99-116.
166. Santos-Magalhaes NS, Pontes A, Pereira VM, Caetano MN. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International journal of pharmaceutics.* 2000;208(1-2):71-80.
167. Das S, Ng WK, Tan RB. Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. II. Evaluation of the imidazole antifungal drug-loaded nanoparticle dispersions and their gel formulations. *Nanotechnology.* 2014;25(10):105102.
168. Surajit D, Wai Kiong N, Reginald BHT. Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: II. Evaluation of the imidazole antifungal

- drug-loaded nanoparticle dispersions and their gel formulations. *Nanotechnology*. 2014;25(10):105102.
169. G. W. H. Hohne WFH, H.-J. Flammersheim *Differential Scanning Calorimetry*. Second Edition ed: Springer 2003.
170. Cheng SZD. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: Applications to Polymers and Plastics*. First Edition ed: ELSEVIER; 2002.
171. Bunjes H, Unruh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):379-402.
172. Lewis RN, Mannock DA, McElhaney RN. Differential scanning calorimetry in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes. *Methods in Membrane Lipids*: Springer; 2007. p. 171-95.
173. Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *J Liposome Res*. 2008;18(3):159-73.
174. Garbett NC, Chaires JB. Thermodynamic studies for drug design and screening. *Expert Opin Drug Discov*. 2012;7(4):299-314.
175. Spink CH. *Differential Scanning Calorimetry*. *Methods in Cell Biology*. Volume 84: Academic Press; 2008. p. 115-41.
176. US Department of Health and Human Services F, CDER, CVM. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidanceComplianceRegulatoryInformation/guidances/ucm070107.pdf>.
177. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69(1):1-9.
178. Kaur IP, Bhandari R, Bhandari S, Kakkar V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*. 2008;127(2):97-109.
179. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological reviews*. 2001;53(2):283-318.
180. Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of drug targeting*. 2004;12(9-10):635-41.
181. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010;31(26):6867-75.
182. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2013;19:29-43.